

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der
Universität Tübingen

**Einfluss von TGF- β auf oxidative Stressreaktionen in
menschlichen Osteoblasten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Bykova, geb. Ustinova, Daria**

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. S. Hoefert

Tag der Disputation: 02.09.2020

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	C
Abbildungsverzeichnis	F
Tabellenverzeichnis	G
Abkürzungsverzeichnis	H
1. Einleitung.....	1
1.1 Knochen	1
1.1.1 Knochen als Organ	2
1.1.2 Knochenfunktion	3
1.1.3 Bestandteile des Knochengewebes	3
1.1.4 Arten von Knochengewebe	7
1.1.5 Knochenbildung und Knochenwachstum	8
1.2 Oxidativer Stress und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	10
1.2.1 Provozierende Faktoren	10
1.2.2 Entstehungsmechanismen von ROS	12
1.2.3 Folgen von überschüssigen ROS im Knochengewebe	13
1.2.4 ROS als wichtige Regulatoren von Signalwegen und Gentranskription	14
1.3 Wachstumsfaktoren.....	15
1.3.1 Transforming Growth Factor β (TGF- β) Superfamilie.....	16
1.3.2 Aufgaben im Knochen	17
1.4 NADPH-Oxidase	19
1.4.1 NOX4	22
1.4.2 Rolle der NADPH-Oxidasen in der Zellmigration.....	24
1.4.3 Inhibitoren von NADPH-Oxidasen.....	27
2. Ziele der Arbeit	30
3. Materialien und Methoden	31
3.1 Materialien.....	31
3.1.1 Chemikalien	31
3.1.2 Verbrauchsmaterial	33
3.1.3 Verwendete Geräte	33
3.1.4 Antikörper.....	34
3.1.5 Lösungen und Puffer.....	34
3.1.6 Software	39
3.2 Methoden	39

Inhaltsverzeichnis

3.2.1 Isolierung und Kultivierung von primären humanen Osteoblasten	39
3.2.1.1 Herstellung von Zellkulturmedien.....	39
3.2.1.2 Isolierung von primären humanen Osteoblasten	40
3.2.1.3 Kultivierung und Passagieren von primären humanen Osteoblasten..	41
3.2.1.4 Zellzahlbestimmung	41
3.2.2 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	42
3.2.2.1 RNA-Isolation.....	42
3.2.2.2 Konzentration, Reinheit und Integrität der RNA	43
3.2.2.3 Synthese von komplementärer DNA.....	44
3.2.2.4 Konventionelle RT-PCR.....	44
3.2.2.5 Gelelektrophorese.....	46
3.2.3 DCFH-DA Assay für die ROS-Messung.....	46
3.2.4 Scratch-Assay	47
3.2.5 Western Blot.....	47
3.2.5.1 Proteinlysate	48
3.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	48
3.2.5.3 Vorbereitung von Proteinproben	49
3.2.5.4 Gelelektrophorese.....	50
3.2.5.4.1 Gel-Zubereitung.....	50
3.2.5.4.2 Western Blot SDS-Page	51
3.2.5.5 Übertragung von Proteinen.....	52
3.2.5.6 Blockierung und Antikörperinkubation.....	53
3.2.5.7 Strippen von Western-Blot-Membranen	54
3.2.6 Immunfluoreszenzfärbung.....	54
3.3 Statistische Analyse	56
4. Ergebnisse.....	57
4.1 Genexpressionsanalyse	57
4.2 Induktion von NOX4-Expression durch TGF- β 1	58
4.2.1 Expression der NOX4	60
4.3 TGF- β 1 beeinflusst die Expression von NOX4 auf Proteinebene.....	60
4.4 Zunahme der ROS-Produktion als Reaktion auf eine erhöhte NOX4-Aktivität	61
4.5 Beschleunigte Wundheilung durch TGF- β	62
4.6 Ergebnisse Western Blot mit FAK, Vimentin und PCNA	64
4.7 Immunfluoreszenzfärbung mit Vimentin zeigt eine Zunahme seiner Konzentration entlang der Migrationskante	66
5. Diskussion	68

Inhaltsverzeichnis

6. Zusammenfassung	76
7. Ausblick	78
8. Literaturverzeichnis.....	79
9. Erklärung zum Eigenanteil.....	90
10. Danksagung	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Oxidative stress.	12
Abbildung 2: NADPH-Oxidase.	21
Abbildung 3: NOX4 moduliert TGF- β bedingte Zellmigration.	27
Abbildung 4: Expression von mit oxidativem Stress assoziierten Genen unter dem Einfluss von TGF- β 1.	57
Abbildung 5: signifikante Genexpression von NOX4 unter TGF- β -Stimulation.	60
Abbildung 6: Western Blot mit NOX4.	61
Abbildung 7: Bestimmung der ROS-Spiegel.	61
Abbildung 8: Scratch-Test:	63
Abbildung 9: Einfluss von rh-TGF- β 1 auf die Migrationsrate von primären humanen Osteoblasten.	63
Abbildung 10: Wirkung des TGF- β -Inhibitors (Alk5i / SB431542) auf die Wundheilung.	64
Abbildung 11: Western Blot Detektion von fokalen Adhäsionskinase (FAK).	65
Abbildung 12: Western Blot Detektion von Vimentin.	65
Abbildung 13: Western Blot Detektion von PCNA.	66
Abbildung 14: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung für Vimentin.	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalienliste	31
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialliste	33
Tabelle 3: Geräteliste	33
Tabelle 4: Antikörperliste	34
Tabelle 5: Liste der verwendeten Lösungen für Isolierung und Kultivierung von primären humanen Osteoblasten	34
Tabelle 6: Liste der verwendeten Lösungen für Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	35
Tabelle 7: Liste der verwendeten Lösungen für ROS-Messung	35
Tabelle 8: Liste der verwendeten Lösungen für Western Blot	36
Tabelle 9: Liste der verwendeten Lösungen für Immunfluoreszenzfärbung.....	38
Tabelle 10: Softwareliste	39
Tabelle 11: PCR-Ansatz	45
Tabelle 12: Lowry Auswertung	49
Tabelle 13: Trenngel-Zubereitung (1 Gel für eine Dicke von 1,5 mm)	50
Tabelle 14: Stapelgel-Zubereitung.....	51
Tabelle 15: Oligonukleotide	58
Tabelle 16: PCR-Bedingungen der Exons.....	58

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Miligramm
µl	Mikroliter
µMol	Mikromol
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
Art.nr.	Artikelnummer
ASS	Acetylsalicylsäure
BMP	Bone morphogenetic protein
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
ca.	circa
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser
DCFH	2'7'-Dichlorofluorescin
DCFH-DA	Dichlorofluorescin diacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPI	Diphenyliodinium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	epithelialer-mesenchymaler Übergang
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ham's F-12	Aminosäurereiches Kulturmedium

Abkürzungsverzeichnis

HSCs	hämatopoetische Stammzellen
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
ml	Milliliter
min	Minuten
mmol	Millimol
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure/ Boten- Ribonucleinsäure
MSCs	mesenchymale Stammzellen
NADPH-Oxidase/ NOX	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
OB	Osteoblast
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
RANKL	Receptor Activator von NF- κ B Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
Sec	Sekunden
SOD	Superoxid-Dismutase
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
U / min	Umdrehungen pro Minute
WB	Western Blot

1. Einleitung

1.1 Knochen

Derzeit gibt es eine große Anzahl von Publikationen zur praktischen Anwendung von Wachstumsfaktoren bei zahnchirurgischen Eingriffen [118-120]. In der Praxis der chirurgischen Zahnheilkunde und Kiefer- und Gesichtschirurgie werden zahlreiche biogene und synthetische Materialien eingesetzt, um die nach Knochenfrakturen, der Entfernung von Zähnen, Tumoren und tumorösen Formationen auftretende Defekte zu füllen. Dadurch sollen mögliche Komplikationen vermieden sowie die Regeneration von Knochengewebe beschleunigt werden [113].

Damit die Knochenbildung unterstützt wird, müssen eine Reihe von Bedingungen eingehalten werden. Dazu gehören Proteinadsorption, Zelladhäsion, Reproduktion lokaler Faktoren, Proliferation, Differenzierung, Osteoidproduktion und Verkalkung [14, 118]. Die Knochenheilung beginnt mit der Bildung eines Hämatoms an der Stelle der Unterbrechung der Knochenintegrität und der Aktivierung von Immunzellen, was zur Entwicklung einer Entzündungsreaktion führt. Genau diese Entzündungszellen sind für die Freisetzung von Zytokinen verantwortlich, das die anschließende Rekrutierung, Infiltration, Proliferation und Differenzierung der für die Knochenreparatur erforderlichen Zellen reguliert [65, 114,115]. Daher ist das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen obligatorisch, um zukünftige therapeutische Konzepte für die verzögerte Frakturheilung und metabolische Knochenerkrankungen zu entwickeln [11].

Die Verwendung von Wachstumsfaktoren bei der Wiederherstellung von Knochengewebe stellt derzeit eine der dringlichsten experimentellen und klinischen Richtungen in der Zahnheilkunde dar [14]. Mehrere Regulatoren, einschließlich Östrogen, Parathormon und TGF- β , wurden mit der Kontrolle der Knochenmasse und -architektur in Verbindung gebracht [10], und stellen deshalb interessante Helfer für die Funktionalisierung von Gewebeersatzmaterialien dar. Das Beispiel von TGF- β zeigt allerdings auch, dass dessen Dysregulation auch mit Erkrankungen des Knochens in Zusammenhang gebracht wird, einschließlich Knochenmetastasen, Osteoarthritis und Knochenfrakturen [10], und deshalb genau untersucht werden muss, welchen Einfluss diese Faktoren im Einzelnen haben.

Basierend auf Arbeiten die zeigen, dass TGF- β 1 als starker Induktor der NOX4-Expression in verschiedenen Zellen fungiert [13, 28, 38], wird vermutet, dass in menschlichen Osteoblasten TGF- β 1 ebenfalls die Expression von NOX4 induziert.

Einleitung

Das Besondere an NOX4 ist, dass es keine Aktivierung benötigt um direkt H_2O_2 zu bilden. Durch Akkumulation des gebildeten H_2O_2 und anderen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird in der Zelle oxidativer Stress ausgelöst [121]. Trotz der Tatsache, dass oxidativer Stress in erster Linie mit Zytotoxizität assoziiert wird, darf die Rolle von ROS bei der Regulation von Signalwegen und Gentranskription nicht außer Acht gelassen werden. Es gibt einige Berichte die mitochondriale ROS mit Zelladhäsion und -migration in Zusammenhang bringen. Diese Berichte geben Hinweise, dass die ROS, welche für diese Zwecke benötigt werden, durch NADPH-Oxidasen erzeugt werden [9]. Zunehmende Beweise legen nahe, dass ROS und insbesondere Wasserstoffperoxid Signalwege aktivieren können [112]. ROS agieren intrinsisch in wandernden Zellen, um die Bewegung zu fördern. Darüber hinaus können sie in den umgebenden stationären Zellen permissiv die Migration beeinflussen [9]. Es wird vermutet, dass mit Hilfe von H_2O_2 die Migration von Osteoblasten reguliert wird [65].

1.1.1 Knochen als Organ

Das Skelett des erwachsenen Menschen besteht aus ca. 206 Knochen, wobei diese Zahl aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl von Kleinknochen individuell leicht variiert [25]. Der Knochen, als ein aus mehreren Geweben aufgebautes Organ, ist ein Bestandteil des Stütz- und Bewegungsapparates, das eine typische Form und Struktur, sowie ein besonderes System der Blut- und Nervenversorgung aufweist. Der Knochen ist vom Periost bedeckt und enthält im Inneren das Knochenmark (Medulla Osseum). Die einzelnen Knochen bestehen zwar hauptsächlich aus Knochengewebe, doch sind an ihrem Bau auch andere Gewebe beteiligt. Jeder Knochen hat eine bestimmte Form, Größe und Position im menschlichen Körper. Die vier allgemeinen Kategorien von Knochen umfassen lange, kurze, flache und unregelmäßige Knochen [15]. Über diese Grundformen hinaus, sind die einzelnen Knochen durch weitere funktionsangepasste reliefbildende Details individuell typisch gestaltet [25].

Die Knochenbildung wird maßgeblich auch von äußeren Faktoren beeinflusst, wie z. B. Ernährung und mechanische Belastung, die die Knochen während der täglichen Aktivitäten des Körpers erfahren. Die funktionelle Aktivität des Skeletts ist notwendig, um die normale Knochenmasse und -architektur während des gesamten Lebens des Organismus aufrechtzuerhalten [117].

1.1.2 Knochenfunktion

Das Skelett ist ein komplexes harmonisches Organ, das in erster Linie als Mittel zur Körperunterstützung und Bewegung dient, z.B. der Hebel für die Muskeln bereitstellt und auch ein ‚Behälter‘ für innere Organe ist [15]. Schädelknochen und Wirbel haben Schutzfunktion für das zentrale Nervensystem (Gehirn und Rückenmark), Becken und Thorax für die dort liegenden inneren Organe. Weiterhin enthalten die menschlichen Knochen bis zu 99% des Kalziums im Körper, weshalb sie als Kalziumreservoir im Rahmen des Mineralstoffwechsels eingesetzt werden und ab dem Zeitpunkt der Geburt der Hauptort der Blutbildung sind [24]. Knochenumbau ist erforderlich für eine gesunde Kalziumhomöostase und für die Reparatur von Schäden, die durch Stress und Alterung auftreten [19].

1.1.3 Bestandteile des Knochengewebes

Knochengewebe ist 2- bis 3-mal schwerer als die meisten übrigen Gewebe [26]. Es besteht aus 50 bis 70 % anorganischer Matrix (Mineralien), 20 bis 40 % organischer Matrix, 5 bis 10 % Wasser und weniger als 3 % Lipiden. Das Hauptmineral von Knochengewebe ist Hydroxylapatit [15]. Dies ist ein hydroxyliertes Komplexsalz, bestehend aus Calcium-, Phosphat- und Hydroxid-Ionen [24]. Neben Hydroxylapatit enthält Knochengewebe verschiedene extrazelluläre Proteine, die Knochenmatrix produzieren [18]. Calcium- und Phosphorsalze sind für die mechanische Festigkeit und Belastbarkeit des Knochens verantwortlich, während die organische Matrix für Elastizität und Flexibilität sorgt [15]. Im Knochen befinden sich darüber hinaus spezialisierte Zellen, die die Funktion von Knochengewebe fördern [14]. Defekte des Knochengewebes können vollwertig regeneriert werden, während alle anderen Gewebe des Bewegungsapparates von Natur aus nur minderwertig durch Narbengewebe repariert werden können [25]. Im Laufe des Lebens verändert sich die Struktur der Knochen. Je jünger die Person ist, desto mehr organische Substanzen sind in den Geweben seiner Knochen enthalten, so dass sie sich in jungen Jahren durch höhere Elastizität auszeichnen. Mit zunehmendem Alter nimmt die Anzahl der Kalzium- und Phosphatsalze ab, was zu einer Instabilität der Knochen führt. Dann besteht erhöhte Bruchgefahr. Ein für das Kind harmloser Sturz kann für einen Älteren lebensgefährlich sein [26].

Osteogene Zellen

Mesenchymalen Stammzellen (MSCs) sind wenig differenzierte Zellen mit hoher Proliferationsaktivität. Sie sind zeitlebens im Periost und Endost anzutreffen [24].

Einleitung

Aus den im Knochenmark lokalisierten MSCs entwickeln sich „**Osteoblasten**“ [42]. Diverse Faktoren können deren Differenzierung aktivieren. Osteoblasten synthetisieren die Bestandteile der interzellulären Substanz und regulieren deren Mineralisierung [15]. Reife Osteoblasten haben große abgerundete Kerne, vergrößerte Golgi-Strukturen und ein ausgedehntes endoplasmatisches Retikulum [15, 18]. In der Ruhephase werden Osteoblasten zu langgestreckten, flachen so genannten „**bone-lining-cells**“. Wenn Osteoblasten sich durch das Ausscheiden unreifer, nicht mineralisierter Knochengrundsubstanz (Osteoid) einmauern, werden Osteoblasten zu „**Osteozyten**“ [24]. Osteozyten werden aus Osteoblasten gebildet, sind definitive Formen dieser Zellen, verlieren ihre Teilungsfähigkeit, und funktionieren in Netzwerken, um die Knochenstruktur und den Metabolismus zu unterstützen. Osteozyten exprimieren normalerweise keine alkalische Phosphatase, jedoch Osteocalcin sowie einige andere Knochenmatrixproteine. Osteozyten sind untereinander durch sogenannte „Gap Junctions“ verbunden, welche für deren Reifung, Aktivität und Überleben erforderlich sind [15]. Osteozyten behalten die strukturelle Knochenintegrität und ermöglichen es dem Knochen, sich an jeden mechanischen und chemischen Reiz anzupassen [18]. Sie scheinen den Umbau von Knochen, das sogenannte „Knochenremodellierung“, zu aktivieren, indem sie sowohl positive als auch negative Regulation sowohl auf Osteoklasten als auch auf Osteoblasten sezernieren [19]. Basierend auf der Position der Osteozyten innerhalb der Knochenmatrix und der zellulären Morphologie wird angenommen, dass Osteozyten zur Kontrolle des Knochenumbaus beitragen sowie zur Detektion von mechanischen Reizen [20, 21]. Darüber hinaus wird angenommen, dass Osteozyten, durch Regulation der Osteoklastogenese, die Knochenremodellierung initiieren [22]. Da Osteozyten bis zu 25 Jahre alt werden, bilden sie einen statischen Pool und machen bei jungen Menschen bis zu 95 % aller Knochenzellen, bei alten aber nur 58 % aller Knochenzellen, aus. Dieser altersbedingte Verlust von Osteozyten scheint mit einem Anstieg von ROS in Zusammenhang zu stehen. Interessanterweise hängt der Tod der Osteozyten dabei vom Alter des Knochens und nicht vom Alter des Subjekts ab [38].

Osteoklasten

Osteoklasten stammen von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) der Monozyten-Makrophagen-Linie ab [15, 18]. Osteoklasten sind riesige mehrkernige Zellen mit einer einzigartigen Fähigkeit, Knochen zu resorbieren [16]. Transkriptions- und

Einleitung

Wachstumsfaktoren wurden als essentiell für die Differenzierung und Funktion von Osteoklasten identifiziert [18]. Dazu gehören der Makrophagenkolonie-stimulierende Faktor (M-CSF) und der Rezeptoraktivator des nuklearen Faktor- κ B (RANK) – Liganden [78]. Eine erhöhte Osteoklastenaktivität kann zu Osteopenie und / oder Osteoporose führen, während eine verringerte Osteoklastenaktivität zu Osteopetrose führen kann [105].

Die Regulation des pH-Werts durch Osteoklasten während der Knochenremodellierung ist ein Mechanismus, der die Knochenneubildung schnell aktiviert [16]. Die Ansäuerung des extrazellulären Raumes durch die Sekretion von Protonen durch Osteoklasten wird als Schlüsselschritt bei der Knochenresorption angesehen [105].

Knochenmatrix

Die Knochenmatrix besteht aus kollagenen Fasern, die kleine Bündel bilden, an welchen Hydroxyapatitkristalle angereicht liegen. Die kollagenen Bündel bestehen hauptsächlich aus Typ-I-Kollagen, mit Spuren von Typ III und V. Typ-I-Kollagen fördert die Mineralisierung von Knochen nicht. Die Matrixreifung ist mit der Expression der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase und verschiedenen nicht-kollagenen Proteinen, einschließlich Osteocalcin, Osteopontin und Knochen-Sialoprotein, assoziiert [15]. Osteocalcin ist dafür bekannt die Bildung von Hydroxylapatit-Kristallen zu begrenzen und dadurch die Resistenz gegen Knochenbrüche zu erhöhen [10]. Phosphoproteinkinasen und die knochenspezifische alkalische Phosphatase regulieren den Mineralisierungsprozess [15]. Somit können Mutationen in bestimmten Proteinen osteoporotische Veränderungen hervorrufen [17]. Zum Beispiel: Funktionsverlustmutationen von RANKL und RANK führen zu einer Osteopetrose mit hoher Knochenmasse, da die Osteoklastenbildung vollständig beeinträchtigt ist [84]. Osteopetrose-Patienten haben trotz erhöhter Knochenmasse eine erhöhte Knochenfragilität. Deswegen sollen die Materialeigenschaften der Knochenmatrix zusätzlich zu Knochenmasse und -architektur bewertet werden, wenn Effekte von Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Arzneimitteln auf die Knochenqualität untersucht werden [10].

Die Bedeutung der Knochenmatrixqualität ist auch bei Osteogenesis imperfecta klinisch offensichtlich.

Jedes Jahr werden 10 % der Knochenmatrix mit Hilfe der Osteoblasten und Osteoklasten erneuert [38]. Differenzierung, Aktivierung und Apoptose dieser Zellen

Einleitung

hängen oft vom Status anderer Arten von Knochenzellen ab. Einschließlich Osteozyten, die nicht nur als Mechanosensoren, sondern auch als endokrine Zellen fungieren [87]. Es wird auch angenommen, dass ein anderer Zelltyp, die Lining cells, eine spezifische Rolle bei der Kopplung der Knochenresorption an die Knochenbildung spielt [85], möglicherweise durch physikalische Definition von Knochenumbaukompartimenten [84, 86]. Der normale Verlauf dieser Prozesse gewährleistet die richtige Entwicklung und Schutzreaktionen des Körpers [14]. Knochenzellen interagieren während des gesamten Erwachsenenlebens miteinander, um die Knochenintegrität aufrechtzuerhalten [16]. Die notwendige Regulierung der Zellproliferation, Differenzierung und zellulären Mobilität wird durch verschiedene Mechanismen erreicht [14].

Die biochemischen Regulationswege umfassen die Bindung von RANKL, das sowohl von Osteoblasten als auch von Osteozyten produziert wird, an RANK, ein Transmembranprotein, das auf Osteoklastenprogenitorzellen vorkommt und für die Differenzierung von Osteoklasten erforderlich ist. Darüber hinaus bindet Osteoprotegerin (OPG), ein von Osteoblasten produziertes Protein, ebenfalls an RANKL und verhindert so die Osteoklastogenese [89]. Transforming growth factor beta (TGF- β) spielt eine stadienabhängige Rolle bei der Differenzierung sowohl von Osteoblasten als auch von Osteoklasten [10].

Im Gegensatz dazu bindet Parathyroidhormon (PTH) an seine Rezeptoren, die auf Osteoblasten und Knochenmark-Stromazellen exprimiert werden, fördert die Expression von M-CSF und RANKL [84] und inhibiert die Erzeugung von OPG [89], was indirekt die Knochenresorption durch Osteoklasten stimuliert [84, 151].

Unter anderen Faktoren, die zur Regulation von Knochenzellen beitragen, wurden Proteine und Hormone wie Stickoxid, Prostaglandine, Vitamin D, Corticosteroide, Interleukine, Calcitonin und der Wnt β -Catenin-Weg erwähnt [88, 89, 92, 93].

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass ROS für die Differenzierung und korrekte Funktionalität einzelner Zellpopulationen im Knochen benötigt werden [38].

Jacobs *et al.* bestätigte, dass auch die mechanische Kraft ein Schlüsselregulator des Knochenumbaus und der Knochenarchitektur im Allgemeinen ist [88]. Experimentell bestätigte Hypothesen beinhalten die Zunahme der Osteoblastenproliferation aufgrund einer erhöhten mechanischen Belastung und eine Zunahme der RANKL-Produktion aufgrund einer verringerten mechanischen Belastung [89].

1.1.4 Arten von Knochengewebe

Basierend auf den strukturellen Merkmalen des Knochens können zwei Arten identifiziert werden: Geflechtknochen (primärer Knochen) und Lamellenknochen (sekundärer Knochen). Während der Embryonalzeit entsteht zuerst ein geflechtartiger Knochen (Faserknochen), der als ein wenig geordnetes Bindegewebe angesehen werden kann [27]. Unter andauernder Zug- und Druckbelastung wandeln sich MSCs in Osteoblasten um und sondern Osteoid (Knochengrundsubstanz und Kollagen) ab, welches verkalkt. Bei jeder primären Knochenbildung erstet zunächst Geflechtknochen. Bei einer Bruchheilung wird beim Erwachsenen auch zunächst dieser Knochentyp gebildet [25]. Dem Geflechtknochen fehlt die regelmäßige Anordnung der versorgenden Blutgefäße [24]. Nur an den Knochenvorsprüngen (Tuberositäten, Apophysen), an denen meist Muskeln und Sehnen befestigt sind, bleibt der geflechtartige Knochen zeitlebens erhalten [27].

Der sekundäre Knochen entsteht nach Abbau von Geflechtknochen und ist den jeweiligen Funktionsanforderungen optimal angepasst [24]. Lamellenknochen hat eine um ein Vielfaches höhere Festigkeit in bestimmten Richtungen. Er ist komplizierter gebaut [25]. Die strukturelle Einheit des Lamellenknochens, die bereits mit einer kleinen Vergrößerung des Mikroskops erkennbar ist, ist das Osteon. Das Osteon stellt ein System von Knochenplatten dar, die konzentrisch um einen zentralen Kanal (Havers-Kanal) angeordnet sind, der Gefäße und Nerven enthält. Osteone haften nicht aneinander, sondern befinden sich in einem Abstand, der mit interstitiellen Platten gefüllt ist. Die Kanäle kommunizieren durch quere Kanäle (Volkmann-Kanäle) [25]. Bei Neubildung von Knochengewebe bildet sich der Lamellenknochen durch Umbau von Geflechtknochen, bei Umbau von Knochengewebe wird Lamellenknochen direkt gebildet [24].

Makroskopisch ist an jedem Knochen eine dicht strukturierte periphere Kompaksubstanz, Substantia compacta, und lockere schwammartige Substanz, Substantia spongiosa, zu erkennen [24]. Die Knochenarchitektur wird durch die kortikale Knochendicke, das trabekuläre Knochenvolumen und deren Organisation bestimmt [10]. Die Verteilung der kompakten und schwammigen Substanz hängt von den Funktionsbedingungen des Knochens ab und das erwachsene menschliche Skelett setzt sich aus ungefähr 4/5 kortikalen Knochen und 1/4 trabekulären Knochen zusammen. Sowohl die kortikale als auch die schwammige Knochenstrukturen bestehen aus Osteonen [15].

1.1.5 Knochenbildung und Knochenwachstum

Die Knochenform ist teils genetisch, teils epigenetisch bestimmt [25]. Knochen ist keine statische Struktur, sondern ein Organ mit relativ hohem Umsatz. Seine konstante Bildung und Degradation sind streng reguliert, sodass die richtige Funktion des Skeletts durch Anpassung an die Belastung stets erhalten bleibt [38]. Ein Knochen entsteht auf zweierlei Weise, entweder „desmal“ oder „chondral“ [24]. Während der Embryonalentwicklung wird die Mehrzahl der Knochen durch Knorpelmodelle vorgeformt, welche dann durch Knochenmaterial ersetzt werden [25]. Diese Art der Knochenbildung wird chondrale Osteogenese genannt. Bei der primären oder desmalen Osteogenese wird Geflechtknochen ohne Umwege direkt aus dem Mesenchym gebildet [24]. In der Folge passt sich der Knochen nur noch den Belastungen an [25]. Die Knochenbildung ist abhängig von der Bindung und Proliferation von Osteoprogenitorzellen, sowie deren Differenzierung in reife Osteoblasten, welche die Knochenmatrix synthetisieren. Des Weiteren ist die jeweilige Lebensspanne der reifen Osteoblasten und Osteozyten entscheidend [35]. Der Knochen unterliegt während des Lebens longitudinalem und radialem Wachstum, Modellierung und Remodellierung [17]. Knochengewebe kann nicht direkt wachsen, weil die Knochenzellen in der Knochenmatrix „eingemauert“ sind und sich wegen der starren Grundsubstanz nicht voneinander trennen können. Knochengewebe kann somit nicht von innen herauswachsen. Knochen werden größer, indem an vorhandenes Knochengewebe neugebildetes angelagert wird. Knochengewebe entsteht dabei durch Umbau von Knorpel oder Bindegewebe [26]. Das Längen- und Radialwachstum erfolgt während der Kindheit und Jugend. Das Längenwachstum findet an den Wachstumsplatten statt, wo sich der Knorpel in den epiphysären und metaphysären Bereichen der langen Knochen vermehrt, bevor er anschließend mineralisiert wird um primären neuen Knochen zu bilden [17]. Da Längenwachstum ist beendet, wenn die Knorpelzellen der Epiphysenfuge ihre Proliferation einstellen (geschlossene Epiphysenfuge). Dies ist normalerweise durch einen steigenden Spiegel von Sexualhormonen beim Einsetzen der Pubertät bedingt [24]. Bei dem Breitenwachstum lagert die Knochenhaut an den vorhandenen Knochen der Rinderschicht immer neuen Knochen an, was zeitlebens möglich ist [26].

Zwei biologische Mechanismen, welche die Festigkeit von Knochen bestimmen, sind Modellierung und Remodellierung. Die Prozesse der Modellierung und

Einleitung

Remodellierung werden durch mechanische Belastungen, vorwiegend Muskelbelastungen, induziert [18].

Modellierung ist der Prozess, bei dem Knochen ihre Gesamtform in Reaktion auf physiologische Einflüsse oder mechanische Kräfte verändern, was zu einer allmählichen Anpassung des Skeletts an diese Kräfte führt. In der Regel erweitern sich die Knochen mit zunehmendem Alter als Antwort auf die periostale Apposition von neuem Knochen und die endostale Resorption von altem Knochen [15]. Modellierung kann somit die Knochenform und -größe durch Knochenbildung (Osteoblasten) an einigen Stellen und durch Knochenzerstörung (Osteoklasten) an anderen Stellen verändern.

Remodelling ist der Knochenumbau der von Osteoklasten und Osteoblasten durchgeführt wird [18]. Dieser Umstrukturierungsprozess, der als " Remodellierung" bezeichnet wird, ist sowohl für die normale Knochenmasse und ihre mechanischen Eigenschaften als auch für die Mineralhomöostase von Bedeutung [20]. Der Prozess der kontinuierlichen Transformation ist für den Knochen natürlich und ermöglicht ihm, nicht nur auf Veränderungen in der äußeren und inneren Umgebung zu reagieren, sondern auch an sich ändernde Belastungen anzupassen und sich von Verletzungen zu erholen [15]. Durch die ausgewogene Wirkung von osteoblastärer Knochenbildung und osteoklastärer Knochenresorption, die hauptsächlich an der Knochenoberfläche auftreten, wird der Knochen ständig erneuert [21]. Diese Prozesse finden normalerweise in einer streng regulierten Abfolge von Ereignissen statt, bei denen die Menge an gebildetem Knochen der Menge an resorbiertem Knochen entspricht [19]. Es wurde postuliert, dass beide Prozesse von ROS beeinflusst werden. Im Falle eines Ungleichgewichts dieser Prozesse treten Krankheiten auf, die mit übertriebener Bildung von neuem Knochen oder Knochenverlust verbunden sind [38].

Die Zellen des Knochens erreichen interzelluläre Kommunikation nicht nur durch Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, sondern auch durch Moleküle und Ionen, die sich im extrazellulären Raum oder über Gap Junctions bewegen. Diese Prozesse, sind stark von der Architektur des Knochengewebes abhängen [16]. Die Kopplungssignale, die das Ende der Knochenresorption mit dem Beginn der Knochenbildung verbinden, sind noch unbekannt. Vorgeschlagene Regulatoren umfassen von der Knochenmatrix abgeleitete Faktoren wie „Transforming growth factor β “ (TGF- β), „Insulin-like growth factor “ (IGF-1), „Insulin-like growth factor 2“

Einleitung

(IGF-2), "Bone morphogenetic proteins" (BMPs), „Platelet-derived growth factor“ (PDGF) oder Fibroblast growth factors“ (FGFs) [113, 127, 128]. Das Endergebnis jedes Knochenremodellierungszyklus ist die Produktion eines neuen Osteons [15].

Der Unterschied zwischen der Menge an altem Knochen, der resorbiert wird, und der Menge an neuem Knochen, der gebildet wird, bestimmt das Gleichgewicht der Knochenremodellierung [15]. In höherem Alter oder bei manchen Erkrankungen wird dieses Gleichgewicht zugunsten des Abbaus verschoben [26]. Knochenverlust ist dabei häufig eine Folge erhöhter ROS-Bildung in knochenmark- und knochenbildenden Zellen, da sich die antioxidative Kapazität vieler Zellen mit zunehmendem Alter verringert [38].

Der Knochenumsatz, die Knochenmineraldichte und insbesondere die Knochenresorption unter physiologischen Bedingungen werden durch den RANK-RANKL-OPG („receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B-receptor“-„receptor activator of NF- κ B ligand“-„osteoprotegerin“) Signalweg streng reguliert. Der Ligand RANKL wird von Osteoblasten, Stromazellen und einige Immunzellen sekretiert, während sein Rezeptor RANK auf Osteoklasten exprimiert wird. Der Köderrezeptor OPG ist ein lösliches RANK-Homolog, der die Reifung und Aktivität von Osteoklasten blockiert und wird unter anderem auch von Osteoblasten exprimiert und freigesetzt. Die Bindung von RANKL an RANK führt zur Trimerisierung des Rezeptors, der einen alternativen Weg NF- κ B (p52) durch eine komplexe Kette von Adaptermolekülen aktiviert, der die Expression von inflammatorischen Zytokinen wie „tumor necrosis factor α “ (TNF- α) initiiert [150]. RANKL ist essentiell, um die Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten zu induzieren und die Osteoklasten-Apoptose zu unterdrücken [siehe Übersichtsarbeit 36].

1.2 Oxidativer Stress und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

1.2.1 Provozierende Faktoren

Stress ist eine unspezifische Reaktion eines Organismus, der externen oder internen Faktoren ausgesetzt ist, die für das Objekt der Exposition entweder positiv oder negativ sein können. Der Organismus wiederum kann eine flexible Anpassungsfähigkeit an den Reizstoff zeigen. So kann man sich Stress als einen Komplex aus Reaktionen des Organismus auf einen Reizstimulus vorstellen. Anpassung ist keine momentane Reaktion des Körpers, sondern ein komplexer Prozess, der in mehreren Phasen abläuft. Am Anfang kann sich der Körper effektiv

Einleitung

an die neue Situation anpassen, aber im Laufe der Zeit sind die Körperreserven erschöpft, was zu strukturellen Veränderungen führen kann.

Freie Radikale, die auch als "aktive Formen von Sauerstoff" bezeichnet werden können, werden im Körper in zahlreichen biochemischen Prozessen gebildet, in denen Sauerstoff beteiligt ist [121]. Bei diesen Prozessen spielen sowohl zelluläre Mechanismen (spezifische Enzyme, Defekte in der mitochondrialen Atmung) als auch exogene Faktoren (Strahlung, Rauchen, Luftverschmutzung, Krankheiten, Verletzungen, Operationen, Medikamente, usw.) eine Rolle [6].

Die ROS-Produktion kann für den Organismus von Vorteil sein und eine Schlüsselrolle bei der angeborenen Immunität spielen. Wenn Phagozyten wie Neutrophile und Makrophagen Mikroben ausgesetzt sind, verbrauchen sie große Mengen an Sauerstoff: Dieser sogenannte "respiratorische Burst" ist dabei hauptsächlich von der Aktivierung von „NADPH Oxidasen“ (NOX) in den Phagozyten abhängig, was zu einer erhöhten Produktion von ROS, signifikanten Veränderungen des pH-Werts und der ionischen Umgebung der Phagosome führt wodurch die mikrobielle Abtötung erfolgen kann [46].

Die Prozesse der ROS-Bildung und der Ausdruck der Körperantwort sind annähernd ausgeglichen. Es ist aber ziemlich leicht, dieses relative Gleichgewicht zugunsten der ROS zu verschieben. Als Folge davon wird die Biochemie der Zelle gestört und oxidativer Stress, der als ein Ungleichgewicht zwischen Bildung und Beseitigung von freien Radikalen definiert werden kann, tritt auf [8].

Oxidativer Stress kann Veränderungen in der Permeabilität von Zellmembranen und der Funktion von membrangebundenen Enzymen hervorrufen (siehe Abbildung 1) und führt dadurch letztendlich zu einer starken Störung des Zellstoffwechsels [6]. Oxidativer Stress verursacht sowohl Schädigungen an Lipiden [121], Basenschäden als auch Strangbrüche in der DNA [8]. Dies kann vermieden werden, indem Zellstrukturen gezielt beeinflusst werden.

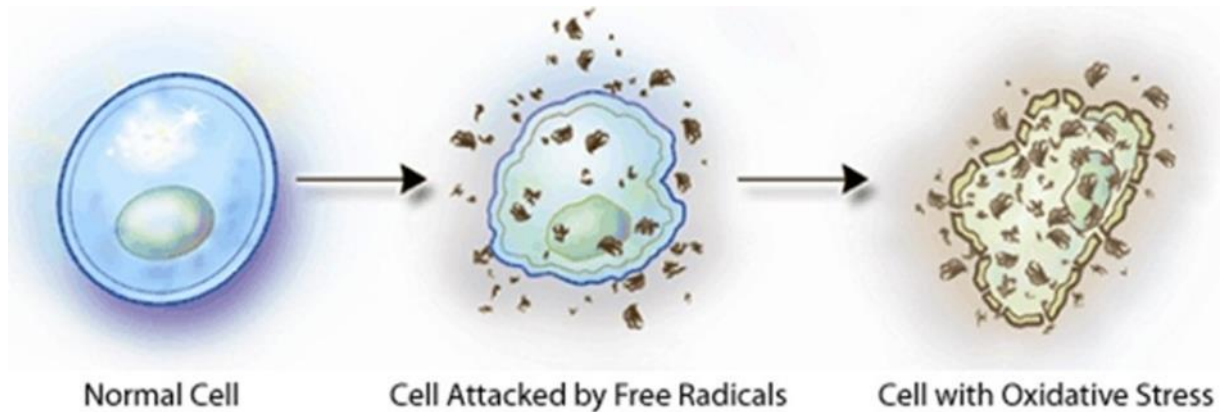


Abbildung 1: Oxidative stress.

Abbildung von <https://www.dralexjimenez.com/wp-content/uploads/2017/09/Oxidative-stress-1130x580.jpg>, abgerufen am 01.02.2018

1.2.2 Entstehungsmechanismen von ROS

ROS bilden sich ständig in einer lebenden Zelle als Produkte des normalen Sauerstoffmetabolismus [7]. ROS enthalten Sauerstoffionen, freie Radikale und Peroxide sowohl anorganischer als auch organischer Herkunft, wie z.B. O_2^- (Superoxidradikal), OH (Hydroxylradikal) und H_2O_2 (Wasserstoffperoxyd) [121]. Ihre Haupteigenschaft ist eine hohe Reaktivität [5]. Zelluläre Quellen von ROS sind verschiedene kleine Moleküle (Eisen, Flavine oder Thiole) oder Organellen, wie Peroxisomen oder Mitochondrien mit Ubiquinon und NADH-Dehydrogenase als enzymatische ROS-Produzenten [38]. ROS werden spezifisch von der NOX-Familie der NADPH-Oxidasen produziert [12].

Ungefähr 95 % des Sauerstoffs in Zellen wird in den Mitochondrien im Prozess der oxidativen Phosphorylierung in Wasser umgewandelt. Die verbleibenden 5 % Sauerstoff werden als Ergebnis verschiedener Reaktionen (üblicherweise enzymatisch) in ROS umgewandelt [7].

Alle möglichen ROS werden als Ergebnis der sukzessiven Addition von Elektronen an das Sauerstoffmolekül gebildet. Sauerstoff ist ein guter Elektronenakzeptor und ein starkes Oxidationsmittel. Für die Bildung von ROS muss Sauerstoff aktiviert werden. Der Reaktivitätsgrad verschiedener Sauerstoffformen ist unterschiedlich und hängt sowohl von der chemischen Natur des Radikals ab, als auch von der Art des Mediums [147]. Das Hydroxidradikal wird als die aktivste Form angesehen, gefolgt von einer protonierten Form des Superoxidanions (OH), das bei physiologischen pH-Werten in begrenzten Mengen gebildet wird [5]. Wenn zwei Moleküle des Superoxidanions miteinander kombiniert werden, wird Wasserstoffperoxid gebildet,

Einleitung

eine sehr aktive Verbindung, die in der Lage ist, schnell in die Zellmembran durch Aquaporinkanäle einzudringen [7, 112].

Gebildete ROSs sind chemisch instabil und reagieren deshalb schnell mit zellulären Strukturen. Alle von ihnen haben chemische Eigenschaften, die verschiedenen biologischen Zielen Reaktivität verleihen [121]. Zur Reaktion mit zum Beispiel DNA, Proteinen oder Lipiden, beschädigen ROS seine Struktur, und machen die betroffene Zelle für die Prozesse der vorzeitigen Alterung und des Abbaus empfindlich [7].

Die Bildung von ROS kann durch den Einfluss von γ -Röntgenstrahlung, UV-Strahlung, Ultraschall, giftige Chemikalien, etc. auf den Organismus induziert werden [5]. Der Schutz der Zelle vor ROS erfolgt durch verschiedene antioxidative Enzyme [7]. Um eine Schädigung der Zelle durch Akkumulation von ROS zu verhindern, haben die Zellen diverse antioxidative Systeme und ROS zerstörende Enzyme wie zum Beispiel Katalase, Superoxiddismutase (SOD) und Glutathionperoxidase [38]. Die natürlichen Antioxidantien sind: Thiolverbindungen, unter denen GSH am häufigsten ist, und Nicht-Thiol-Verbindungen wie Polyphenole, Vitamine und auch verschiedene Enzyme [8].

1.2.3 Folgen von überschüssigen ROS im Knochengewebe

Der Überschuss an ROS kann die Ursache oder der begleitende Faktor sein, der zur Entwicklung verschiedener pathologischer Zustände oder degenerativer Veränderungen im menschlichen Körper beiträgt [7, 112]. Viele Krankheiten sind mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht worden, einschließlich Knochenerkrankungen [8]. NADH und NAD⁺ sind für den Metabolismus und das Redoxsignaling entscheidend [36, 148]. Durch Störung des Gleichgewichts von NADH und NAD⁺ kann oxidativer Stress die zelluläre Signalübertragung stören [8]. Die Konsequenz des NADH:NAD⁺-Redox-Ungleichgewichts ist anfänglich reduzierender Stress, der schließlich zu oxidativem Stress und oxidativer Schädigung von Makromolekülen, einschließlich DNA, Lipiden, Proteinen und im Folgenden zu einer Vielzahl von metabolischen Syndromen, führt [37]. Dieser chemisch-toxischen Sicht auf ROS steht ihr Beitrag zur zellulären Signaltransduktion gegenüber, die eine Folge ihrer kontrollierten Bildung durch NADPH-Oxidasen der NOX-Familie ist [38].

Die Veränderungen des Redoxgleichgewichts sind auch mit dem Prozess der Knochenremodellierung verbunden und scheinen an der Pathogenese des Knochenschwundes beteiligt zu sein [8]. Die Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) induzieren die Aktivierung von pro-apoptotischen Signalen

Einleitung

in Osteoblasten und Osteozyten [122]. Dies begünstigt die Osteoklastogenese und hemmt die Mineralisierung und Osteogenese [8]. Osteozyten sind langlebige Zellen und daher empfindlicher als andere Arten von Knochenzellen gegenüber molekularen Veränderungen, wie erhöhten ROS-Spiegeln [123]. Übermäßige Apoptose von Osteozyten korreliert mit oxidativem Stress, was zu einem Ungleichgewicht zugunsten der Osteoklastogenese und dadurch zu einem erhöhten Abbau von Knochen führt [8]. Antioxidantien, die entweder direkt oder indirekt der Wirkung von Oxidationsmitteln entgegenwirken, tragen dazu bei, die Differenzierung von Osteoblasten und somit den Mineralisierungsprozess zu fördern sowie die Osteoklastenaktivität zu verringern [8]. Einige Berichte zeigen eine Verbindung zwischen Nährstoffen, Antioxidantien und Knochengesundheit [79-81]. Aktuelle Berichte zeigen die antioxidativen Eigenschaften verschiedener Nährstoffe und deren Einfluss auf den Knochenstoffwechsel [80, 81]. Ernährungsstrategien bei Tieren oder einzelnen Gruppen von Patienten mit Osteoporose oder entzündlichen Knochenkrankheiten legen die Verwendung von Antioxidantien in antiresorptiven Behandlungsstrategien zur Verhinderung von Knochenschwund nahe [8]. Es wurde schon bestätigt, dass durch Gonadektomie verursachter Knochenverlust bei Männern oder Frauen durch Antioxidantien abgeschwächt wird [123].

1.2.4 ROS als wichtige Regulatoren von Signalwegen und Gentranskription

Ursprünglich als völlig unerwünschte Nebenprodukte der oxidativen Atmung angesehen, sind ROS heute als Signalmoleküle bekannt, die verschiedenen zellulären Funktionen wie Zellproliferation, -migration und -adhäsion regulieren [9, 112]. So haben ROS neben einer potenziell schädlichen Rolle auch wichtige Funktionen als sekundäre Botenstoffe [38, 112, 116, 122]. Nicht nur die Art der ROS, sondern auch ihre lokale Konzentration bestimmen gemeinsam, ob die Übertragung von Redoxsignalen oder eine Schädigung durch oxidativen Stress auftritt [122].

Der Mechanismus, der die Übertragung von Signalen in der Zelle reguliert, wird aktiv untersucht. Es wird angenommen, dass sich als Reaktion auf die Wirkungen von Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Insulin usw. auf der Oberfläche von Zellen oder innerhalb intrazellulärer Kompartimente, wie Mitochondrien ROS ansammelt, die durch NADPH-Oxidasen gebildet werden. Wenn ROS in das Zytoplasma eintritt, reagieren sie mit spezifischen Proteinen, wodurch Proteinmoleküle oxidativ modifiziert werden und ihre Funktion moduliert wird [9]. Die

Einleitung

daraus resultierenden Veränderungen in der Proteinaktivität steuern teilweise zelluläre Prozesse wie Migration [9]. So können ROS durch oxidative Modifikation auf Protein-Tyrosin-Phosphatasen, Redox-abhängige Transkriptionsfaktoren und DNA wirken. Eine frühere Studie, in der ein Screening für Cystein-glutathionylierte Proteine beschrieben wurde, zeigte, dass mehrere Zytoskelettproteine wie Actin, Cofilin, Vimentin und Profilin redox-sensitiv sind [36]. Sobald der Stimulus nicht mehr vorhanden ist, werden die ROS abgebaut und das System kehrt in seinen ursprünglichen Zustand zurück [9].

1.3 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind typischerweise kleine Polypeptide, die die Proliferation bestimmter Zelltypen stimulieren oder inhibieren. Sie können im Labor gentechnisch gewonnen und in der Therapie eingesetzt werden. Wie Hormone haben diese Faktoren eine große biologische Bandbreite von Auswirkungen, die viele Zellen beeinflusst, wie zum Beispiel die Stimulation oder Inhibierung von Mitose, Chemotaxis oder Differenzierung. Im Gegensatz zu Hormonen werden Wachstumsfaktoren normalerweise von nicht-spezialisierten Zellen in allen Geweben produziert. In der Regel werden sie von einer Zelle sekretiert und wirken auf andere Zellen, obwohl es manchmal vorkommt, dass sie auf dieselben Zellen wirken, die sie sekretieren. Wachstumsfaktoren wirken auf ihre Zielzellen, die sich von anderen Zellen durch Rezeptoren unterscheiden, die auf der Oberfläche von Zellmembranen exprimiert sind und spezifisch für diesen Zelltyp sind. Da dieselbe Zelle mit mehreren Wachstumsfaktoren interagieren kann, kann ein einzelner Wachstumsfaktor verschiedene Zelltypen beeinflussen [113]. Es ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren mit einem hohen Grad an Affinität mit den entsprechenden Rezeptoren wechselwirken und mehrere Effekte auslösen können. Die Wirkung von Wachstumsfaktoren kann im Gegensatz zu Hormonen mehrere Tage andauern [14]. Die Stimulation von Rezeptoren an der Zelloberfläche mit Wachstumsfaktoren und Chemokinen erzeugt ROS, wodurch Signale von der Zelloberfläche an wichtige Signalproteine in der Zelle weitergeleitet werden. ROS wirken innerhalb von Zellen, um die Migration zu fördern, und auch in nicht-migrierenden Zellen, um das Verhalten von wandernden Zellen zu beeinflussen [9].

Das ganzheitliche Bild der Wechselwirkung einer Vielzahl von Faktoren mit einer Vielzahl von Zellen ist sehr komplex, zumal oft sogar ein einzelner Wachstumsfaktor mehrere Funktionen hat [14]. Sowohl das Expressionsniveau eines bestimmten

Einleitung

Wachstumsfaktors als auch die Empfindlichkeit und die Art der Reaktion sind für jeden Zelltyp spezifisch [113]. Die Entfernung von Wachstumsfaktoren aus der Umwelt führt nicht immer dazu, die Zellteilung einfach zu stoppen, sondern verursacht oft einen programmierten Zelltod. Wachstumsfaktoren fördern nicht nur die Zellteilung, sondern umgekehrt hemmen einige von ihnen diesen Prozess. Dies ist im Folgenden am Beispiel der TGF- β Superfamilie gezeigt [14].

1.3.1 Transforming Growth Factor β (TGF- β) Superfamilie

Gegenwärtig sind etwa 40 Mitglieder der TGF- β Superfamilie bekannt [14]. Ihre grundlegenden biologischen Eigenschaften sind mit der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Mobilität und Adhäsion verschiedener Zellen, Beteiligung an Reproduktionsprozessen, Embryonalentwicklung, Regulation von Nervenwachstum, Knochenbildung, Hämatopoese, Wundheilung und immunologischer Toleranz verbunden [2]. TGF- β ist ein wichtiger Regulator des Wachstums und der Apoptose. Die Fähigkeit von TGF- β , den programmierten Zelltod zu induzieren oder zu unterdrücken, variiert jedoch stark in Abhängigkeit vom Zelltyp [28].

Es gibt drei Isoformen von TGF- β : TGF- β 1, - β 2 und - β 3. Viele Zelltypen sekretieren TGF-beta, einschließlich Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und alle Arten von Lymphozyten. Der Knochen gilt jedoch als Hauptproduzent von TGF- β . Dort wird das TGF- β in einer inaktiven (latenten) Form, welches den beiden Polypeptiden, latent TGF-Beta-Bindungsprotein (LTBP) und Latenz-assoziiertes Peptid (LAP) verbunden ist gebildet. In vielen Fällen wird der TGF- β -Vorläufer sogar vor der Sekretion vom Propeptid abgespalten, bleibt jedoch aufgrund nicht-kovalenter Bindungen mit diesem Komplex assoziiert und wird in die extrazelluläre Matrix eingebaut [3]. Erst durch Eliminierung des LAP-Propeptids unter Beteiligung von den Faktoren wie Proteasen, Integrine, Veränderungen pH, aktive Formen von Sauerstoff kann das TGF- β seine biologische Aktivität erlangen [2, 3]. Mutationen oder Veränderungen in LAP oder LTBP können die Signalübertragung des TGF- β -Signalweges empfindlich stören, was zu einer Reihe von Komplikationen führen kann, einschließlich Autoimmunerkrankungen, Krebs und Katarakten [2].

Seine biologische Wirkung hat TGF- β , wenn es an Rezeptoren (TGF- β Rezeptor I und II) auf der Zellmembran gebunden ist [1]. Signale von TGF- β werden durch einen Komplex aus Transmembranen-Serin/Threonin-Kinasen vom Typ I und Typ II übertragen. Nach Bindung des Liganden phosphoryliert der Rezeptorkomplex die intrazellulären Effektoren Smad2 und Smad3, welche mit Hilfe von Smad4 in den

Einleitung

Zellkern translozieren, um die Genexpression zu regulieren [10]. Intensive Forschungen in den letzten Jahren zeigten, dass TGF- β nicht nur die kanonische Kaskade von Smad-Proteinen aktivieren kann, sondern auch andere Signalwege [4]. Patienten mit Leberfibrose oder Leberzirrhose zeigen z.B. häufig über einen langen Zeitraum erhöhter Serumspeigel von aktivem TGF- β [11, 82, 83]. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei Herzfibrose oder chronischem Nierenversagen [11]. Die Verteilung dieses Wachstumsfaktors über den Blutkreislauf im Körper kann andere Organe beeinflussen [11]. Neuere Beobachtungen legen nahe, dass ROS eine wichtige Rolle beim TGF- β -induzierten epithelialen-mesenchymalen Übergang (EMT), Genexpression, Zytoskelettlagerung und Zellmigration spielen [36, 144, 146]. An der ROS-Produktion durch TGF- β sind verschiedene Mechanismen beteiligt [28]. TGF- β Rezeptoren reagiert auf der Zelloberfläche und stimulieren die NADPH-Oxidase zur Produktion von ROS. Somit ist TGF- β ein pleiotropes immunregulatorisches Zytokin, deren Aktivität von Faktoren wie dem Stadium der Differenzierung und der Art der Zielzellen sowie bestimmten Zytokinen und kostimulatorischen Membranmolekülen beeinflusst wird [1].

1.3.2 Aufgaben im Knochen

Die TGF- β Superfamilie spielt eine Schlüsselrolle bei der Knochenhomöostase. Die systemische oder topische Anwendung von Proteinen dieser Familie wirkt sich häufig positiv auf die Knochenheilung *in vivo* aus [11]. Mehrere Mausstudien legen jedoch nahe, dass TGF- β auch die Knochenstruktur negativ beeinflussen kann [29, 30]. TGF- β ist eines der am häufigsten vorkommenden Wachstumsfaktoren im menschlichen Körper [30]. Sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten sezernieren alle drei TGF- β -Isoformen die in ihrer latenten Form innerhalb der Knochenmatrix vorhanden sind [11, 118]. Von der TGF- β -Superfamilie zeigte TGF- β 1 die stärkste chemotaktische Wirkung gegenüber humanen Osteoblasten [11, 32] und beeinflusst Osteoblastendifferenzierung, Matrixbildung und Mineralisierung [32].

Das Vorhandensein von Rezeptoren für TGF- β auf der Oberfläche von Osteoblasten und Chondrozyten ermöglicht eine Beteiligung dieser Faktoren in allen Stadien der Knochenregeneration [14, 118]. TGF- β interagiert mit vielen bekannten Faktoren in der Osteogenese, wie Prostaglandin E2, Parathormon-verwandtem Peptid und so weiter. Es übt seine Funktionen sowohl während der Embryogenese als auch im erwachsenen Organismus aus [32].

Einleitung

Während der Embryonalentwicklung spielt TGF- β 1 eine Rolle bei der Migration von Zellen an die Stelle der zukünftigen Skeletogenese, der epithelialen-mesenchymalen Interaktion und der Bildung von Zellansammlungen, welche die allgemeine Form der zukünftigen Skelettelemente bestimmen. Es beeinflusst auch die normale Skelettentwicklung, indem es eine kritische Rolle beim Induzieren der Differenzierung von MSCs zu entweder Chondrozyten oder Osteoblasten spielt [32].

Die Wirkungen von TGF- β variieren wesentlich in Abhängigkeit von dem Zellsystem [11]. Wie bereits erwähnt, spielt TGF- β 1 eine stufenabhängige Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten- und Osteoklasten [10]. Während des Erwachsenenlebens hat TGF- β 1 einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung des normalen Skeletts, indem es die Funktion der osteoblastären Zellen entscheidend beeinflusst [32]. TGF- β inhibiert die Osteoblastendifferenzierung, stimuliert jedoch die Proliferation mesenchymaler Vorläuferzellen [118] und erweitert dadurch die Zellpopulation, die sich zu Osteoblasten differenzieren wird [10]. Wenn die TGF- β -Wirkung durch Inhibierung der TGF- β -Typ-I-Rezeptorkinase unterdrückt wird, wird die Hemmung der terminalen Differenzierung von Osteoblasten und Mineralisierung tatsächlich aufgehoben [31].

Da TGF- β die Produktion von Osteocalcin hemmt, sind andere Faktoren notwendig, um eine terminale Differenzierung von Osteoblasten zu induzieren [33]. Die späteren Stadien werden durch BMP2, -7 oder -9, die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie sind, positiv reguliert. Daher wirkt TGF- β 1 mit BMP zusammen, um die Differenzierung von Osteoblasten zu regulieren [42]. Es wurde schon bewiesen, dass Knochenanomalien bei verschiedenen Formen von Osteopenie hauptsächlich auf eine fehlerhafte Rekrutierung von Osteoblasten zurückzuführen sind [34]. Diese Anomalien in der Osteoblastenfunktion und Knochenbildung sind mit Veränderungen in der Expression oder Produktion von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie IGFs und TGF- β verbunden [35]. Knochenverlust, der mit dem Altern zusammenhängt, ist durch verminderte Osteoblastenvermehrung und verringerte lokale Konzentrationen von IGFs und TGF- β gekennzeichnet [34]. Die Tatsachen weisen darauf hin, dass sowohl Änderungen der Produktion von Wachstumsfaktoren als auch Veränderungen in der Zellreaktivität auf die lokalen Wachstumsfaktoren zu Knochenbildungsanomalien beitragen können, wie sie bei diesen osteopenischen Störungen beobachtet wurden [34, 148].

Einleitung

Studien an Föten und neugeborenen Mäusen haben gezeigt, dass TGF- β verschiedene Schritte in der Kaskade der Osteoklastenentwicklung, -rekrutierung und -aktivierung moduliert, wodurch die Differenzierung von Osteoklasten von Knochenmarkmonozyten gehemmt, die osteoklastische Resorption in Knochenkulturen mit differenzierten Osteoklasten aber stimuliert wird [90, 91]. Es wird angenommen, dass die Mikroumgebung der Osteoklasten während der Knochenresorption sauer ist, wodurch das TGF- β -Reservoir aktiviert wird, was wiederum die Knochenbildung stimulieren sollte [97]. Wird TGF- β so in seiner aktiven Form lokal freigesetzt ist es ein starkes Knochenwachstumsstimulans [30]. Die Aktivierung von Makrophagen an der Entzündungsstelle führt dazu, dass Patienten mit chronischer Entzündung häufig einen konstant erhöhten Spiegel an aktivem TGF- β 1 sowie verringerten Knochenmineralgehalt in den Knochen und eine gestörte Knochenheilung aufweisen [11].

Die Expression von Osteopontin, Osteonectin, Kollagen Typ I und Matrix-Metalloproteinasen wird auch durch TGF- β reguliert. [10, 30, 94, 118]. Da diese Proteine als Regulatoren des Mineralisierungsprozesses fungieren [98], können durch eine Änderung des Expressionsniveaus mit Hilfe von TGF- β die mechanischen Eigenschaften und die Konzentration von Mineralien in der Knochenmatrix beeinflusst werden [10]. Es besteht eine direkte Beziehung zwischen der Regulation der Genexpression durch TGF- β und den mechanischen Eigenschaften der Knochenmatrix [10]. So stört TGF- β beispielsweise die Expression der Gene für Kollagen Typ I, alkalische Phosphatase, Osteopontin und Osteocalcin und hemmt die mRNA-Expression für das BMP-2 [30]. Chronisch erhöhte TGF- β Spiegel verursachen Ablagerungen in der Knochenmatrix welche das Elastizitätsmodul und die Härte verringern. Im Gegensatz dazu führte die Reduzierung des TGF- β -Signalings zur Produktion einer Knochenmatrix mit erhöhtem Elastizitätsmodul und erhöhter Härte [10].

1.4 NADPH-Oxidase

ROS sind essentielle Mediatoren der normalen Zellphysiologie [13]. Die Familie der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase, NOX) produziert ROS in einer kontrollierten und gezielten Weise, um die Signaltransduktion spezifisch zu regulieren [38]. NADPH-Oxidase ist ein Mehrkomponenten-Enzymsystem aus transmembranen Hämoproteinen, welches in vielen Zelltypen exprimiert wird [46, 48] und die Elektronen durch die Zellmembran von einem cytosolischen Elektronendonator

Einleitung

(im Allgemeinen NADPH oder NADH) zu einem Elektronenakzeptor (Sauerstoff) im extrazellulären oder luminalen Raum transportieren [46]. Alle NADPH-Oxidasen enthalten FADH- und NADPH-Bindungsstellen an ihrem C-Terminalen Ende [38]. Anhand der spezifischen katalytischen NOX- oder DUOX-Untereinheiten, wurden bisher sieben Mitglieder der NADPH-Oxidase-Familie in Säugetiergeweben identifiziert [9]. Darüber hinaus gehören dem NOX-System mehrere regulatorische Proteine an, wie die Organisator-Untereinheiten p47phox und NOXO1, und die Aktivator-Untereinheiten p67phox und NOXA1 [46]. Aktivierungsmechanismen und Gewebeverteilung der verschiedenen Familienmitglieder unterscheiden sich stark [28]. Aktuelle Studien zeigen die signifikante Rolle des genetischen Hintergrunds bei der Regulation der NADPH-Oxidasen [40]. Die Bindung von Wachstumsfaktoren und Chemokinen an Zelloberflächenrezeptoren aktiviert NADPH-Oxidasen zur Bildung von ROS [9]. Diese ROS regulieren spezifisch zahlreiche Signalwege und ermöglichen beispielsweise eine Signaling durch die vorübergehende Hemmung von Phosphatasen [38]. NADPH-Oxidasen erzeugen in erster Linie Superoxid Radikale, welche zwar selbst als Redoxsignale wirken können, jedoch in den meisten Fällen entweder spontan oder enzymatisch durch Superoxid-Dismutasen (SODs) zu Wasserstoffperoxid abgebaut werden [110]. Das gebildete Wasserstoffperoxid bewirkt dann direkte zelluläre Änderungen für die Migration [9]. Es gibt Hinweise darauf, dass einige NADPH-Oxidase-Isoformen wie NOX4 auch direkt Wasserstoffperoxid freisetzen können [107]. Es wird angenommen, dass H₂O₂ für die meisten Auswirkungen des stromabwärts gelegenen NOX4 verantwortlich ist [124]. Entweder direkt oder indirekt verursacht Wasserstoffperoxid selektive posttranslationale Modifikationen von Proteinen und moduliert deren Funktion [9]. Jedoch muss beachtet werden, dass eine Überaktivierung von NADPH-Oxidasen zu oxidativem Stress führt und die Enzyme daher nicht nur anregende Regulatoren der zellulären Funktion sind, sondern auch potenzielle Arzneimittelziele darstellen [38]. NOX1 und NOX2 werden höchstwahrscheinlich durch Rac1 in Kombination mit anderen regulatorischen Untereinheiten aktiviert [28]. Aufgrund ihrer Lokalisation in der Plasmamembran erzeugen NOX1 und NOX2 •O₂⁻ zum extrazellulären Raum hin. Zusätzlich zur Aktivierung der NOX-abhängigen ROS-Produktion spielt Rac1 eine wesentliche Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts [38]. Rac-abhängige Isoformen der NADPH-Oxidasen tragen nur zur sehr frühen ROS-Produktion durch TGF-β bei und Rac-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die später induzierte

Einleitung

Apoptose [28]. Die zweite Gruppe von NADPH-Oxidasen besteht aus den Kalzium-abhängigen NOX-Enzymen [38]. Diese, nämlich NOX3, NOX5, DUOX1 und DUOX2 scheinen Rac1-unabhängig zu sein [28, 38]. Zur dritten Gruppe von NADPH-Oxidasen gehört nur NOX4, welches konstitutiv aktiv ist [126] und die ROS-Produktion des Enzyms hauptsächlich durch sein Expressionsniveau gesteuert wird [96].

Im Gegensatz zu NOX1, NOX2 oder NOX3 ist NOX4 für die Bildung des NOX-Funktionskomplexes nicht von zytosolischen Untereinheiten abhängig (siehe Abbildung 2) [105], aber wie bei den anderen drei genannten NOX-Vertretern ist das kleine Transmembranprotein p22phox für die Stabilisierung von NOX4 und die Produktion von H_2O_2 erforderlich [96]. Daher scheint der Mechanismus, durch den p22phox mit NOX4 interagiert und es aktiviert, in Bezug auf NOX1, NOX2 oder NOX3 nicht kanonisch zu sein [95].

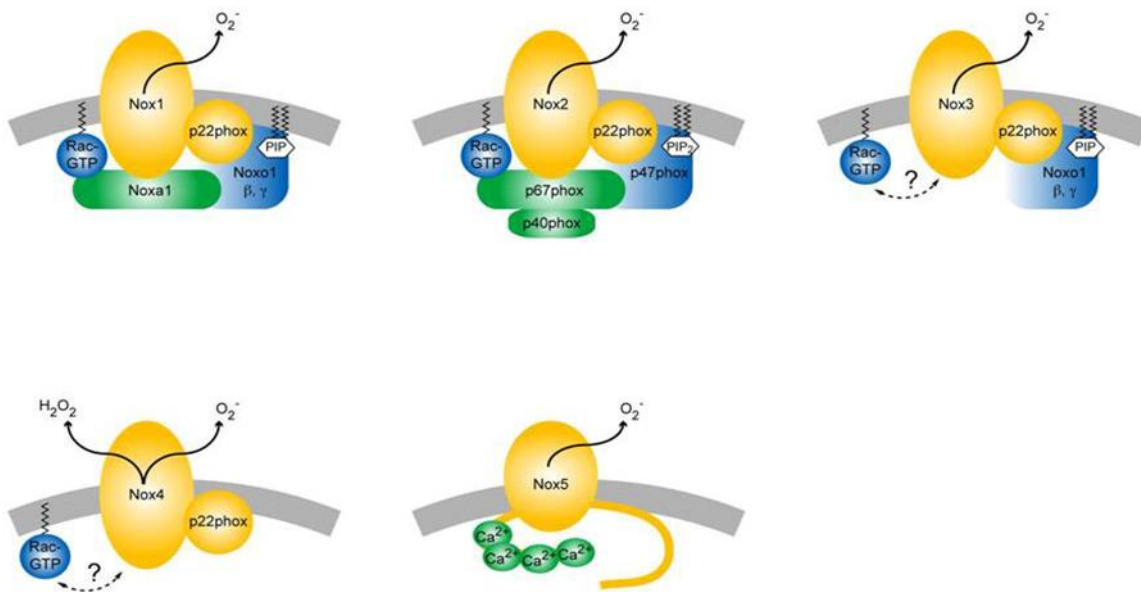


Abbildung 2: NADPH-Oxidase.

Abbildung aus Medicine, Nursing and Health Sciences; Monash University, Australia <http://www.med.monash.edu.au/pharmacology/research/nox-link.html> abgerufen am 10.03.2018.

Modell der NADPH-Oxidasen und ihrer regulatorischen Untereinheiten. NOX1-4 sind an der Membran lokalisiert, die mit dem p22phox-Protein assoziiert ist. NOX4 wird von keiner der bekannten regulatorischen Untereinheiten reguliert. Auch der Einfluss von Rac auf NOX4 Aktivität wird noch diskutiert [28].

Für eine lange Zeit wurde angenommen, dass die Bildung von $\bullet\text{O}_2^-$ durch NADPH-Oxidasen nur in Phagozyten auftritt [28]. In Phagozyten wird der NOX Enzymkomplex aktiviert, um $\bullet\text{O}_2^-$ und andere sekundär abgeleitete ROS zu

Einleitung

erzeugen, welche die Abtötung eindringender Mikroorganismen ermöglichen. Es ist jedoch mittlerweile allgemein bekannt, dass NADPH-Oxidasen und verwandte Enzyme auch an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind, die nicht direkt mit der Wirtsabwehr zusammenhängen. Dazu gehören unter anderem Signaltransduktion, Zellproliferation und Apoptose. Aus diesem Grund sind diese Enzyme im Wesentlichen in jedem Organsystem im Körper vorhanden und tragen zu einer Vielzahl von physiologischen Ereignissen bei [41].

Die biochemische Aktivität dieser Enzyme ist nicht so hoch spezialisiert und auf eine einzelne Funktion beschränkt, wie zuvor angenommen [103], jedoch weisen einige der NOX-Enzyme ein typisches organspezifisches Expressionsmuster auf [38]. Das NOX3-Expressionsmuster ist sehr spezifisch nicht nur auf mRNA-, sondern auch auf Proteinebene [103] und hauptsächlich auf das Innenohr beschränkt, wo es die Bildung von Otolithen fördert [38]. Im Gegensatz dazu wird das Vorhandensein von NOX2 in einer großen Anzahl von Geweben beschrieben, einschließlich der Thymusdrüse, des Dünndarms, des Dickdarms, der Milz, der Bauchspeicheldrüse, des Eierstocks, der Plazenta, der Prostata und des Hodens [105]. NOX1, NOX2 und NOX4 wurden auch in Knochenzellen wie Osteoklasten und Osteoblasten sowie in Chondrozyten gefunden [38]. Zum Beispiel scheint NOX1 für die Differenzierung eines Vorläufers in einen reifen Osteoklasten als Reaktion auf den Ligandenrezeptoraktivator NFκB RANKL notwendig zu sein [105]. Im Gegensatz dazu scheint NOX2 Mediator des ersten oxidativen Blitzes nach RANKL-Stimulation von Osteoklasten-Vorläufern zu sein, ist jedoch nicht notwendigerweise an dem Prozess der Osteoklastendifferenzierung *per se* beteiligt [38]. Derzeit verfügbare Studien legen nahe, dass die Expression von NOX4-mRNA und -Protein in reifen Osteoklasten höher ist als bei Osteoklastenvorläufern [105]. Dabei scheint NOX4 an der Differenzierung von Osteoblasten beteiligt zu sein, während NOX2 die Proliferation von Osteoblasten-Vorläuferzellen beeinflusst [38, 149].

Da NOX als zelluläre funktionale Enzyme ROS auch während eines Entzündungsprozesses erzeugen, stellen sie vielversprechende Ziele für die Regulation der ROS-Spiegel dar [47].

1.4.1 NOX4

NOX4 ist ein Mitglied der NADPH-Oxidase-Familie und eine Quelle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [36]. Es zeigt ein einzigartiges pharmakologisches Profil und eine spezifische Lokalisierung [28]. Die Lokalisierung der aktiven Form von

Einleitung

NOX4 ist primär in den perinukleären Bereichen und im ER, ist jedoch auch auf der Plasmamembran, fokalen Adhäsionen und assoziierten Mitochondrien zu finden, abhängig vom Zelltyp und dem Vorhandensein physiologischer Stresssituationen [103, 124]. NOX4 ist ein Flavocytochrom mit 578 Aminosäuren und sechs Transmembrandomänen, das Superoxid durch den Transport von Elektronen aus dem zytosolischen NADPH über biologische Membrane zu molekularem Sauerstoff bildet [36]. Das NOX4-Protein zeigt eine Identität von 39% zu gp91phox, dem Prototyp der NOX-Familie [36, 104, 105]. Tatsächlich könnte NOX4 die Proteinoxidation in direkter Nähe regulieren und Signale erzeugen, einschließlich der Regulierung der Aktivität von Kinasen, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren, die sich von denen in Caveolae und Endosomen unterscheiden [124]. Das endgültige Gleichgewicht zwischen diesen Aktionen könnte vom Zellphänotyp und/oder dem Zellkontext abhängen [28]. NOX4 wurde ursprünglich als NADPH-Oxidase beschrieben, die in der Niere stark exprimiert wird [104], aber es wird auch in anderen menschlichen Geweben nachgewiesen, einschließlich Knochen, Gefäßgeweben, Lungen, Leber, Krebszelllinien und fötalen Geweben [103, 124]. In Zellen der mesenchymalen Linie wird NOX4 in differenzierten Zellen in kleinen Mengen und in undifferenzierten Zellen in höheren Konzentrationen exprimiert. NOX4 erzeugt hauptsächlich H_2O_2 durch den Transfer von zwei Elektronen durch die Membran auf Sauerstoff. H_2O_2 hat einen starken Einfluss auf die zelluläre Homöostase und beeinflusst eine große Anzahl von Signalkaskaden [43, 122]. Im Vordergrund stehen, insbesondere die Regulation von Wachstum und Zelldifferenzierung durch den zweiten Botenstoff H_2O_2 [103]. Akt und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen stellen sich als am besten charakterisierten Enzymsystemen dar, die von H_2O_2 beeinflusst werden [43]. Kleine Mengen von H_2O_2 können chemotaktische Aktivität induzieren [116]. In einer hohen Konzentration wirkt H_2O_2 als entzündungsähnliches Stresssignal und induziert daher wiederum NOX4 [38].

NOX4 assoziiert mit dem Protein p22phox auf internen Membranen, wo ROS-Bildung auftritt und konstitutiv große Mengen an $\bullet O_2^-$ produziert wird [28, 124]. Es wurde berichtet, dass das Expressionsniveau von NOX4 direkt zu seiner enzymatischen Aktivität [105, 124] führt und dass NOX4 in verschiedenen Zelltypen konstitutiv exprimiert wird [69].

Einleitung

Insbesondere wurde NOX4 als eine TGF- β -induzierte Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) identifiziert, die an der Regulation von Zellreaktionen wie Veränderungen des Zytoskeletts in Endothelzellen, Differenzierung von Osteoblasten, Proliferation von Lungenfibroblasten und erhöhtem oxidativem Stress bei Virusinfektionen beteiligt ist [36]. Das Inkubieren von Zellen mit TGF- β induziert NOX4 und erzeugt einen Anstieg des Rac1-Proteinspiegels, der wiederum sich als ein entscheidender Faktor bei der Signalübertragung zum Zellkern darstellt [28]. Es ist möglich, dass NOX4-abhängige ROS Signalkomponenten modulieren oder den extrazellulären Matrixmetabolismus (ECM) durch direkte Oxidation von Proteinen beeinflussen, die an den Prozessen des endothelialen-mesenchymalen Übergangs (EMT) beteiligt sind [36, 144, 146]. Darüber hinaus wurde berichtet, dass die Expression des konstitutiv aktiven TGF- β -Rezeptors Typ-1 die NOX4 Expression (mRNA), Synthese (Protein) und Aktivität (ROS Bildung) fördert [36]. Die Arbeiten zeigen, dass die NOX4-Induktion durch TGF- β auf Transkriptionsebene auftritt und dadurch induzierte Überlebenssignale der TGF- β Wirkung entgegenwirken können [28]. Das proximale regulatorische Element des NOX4-Gens enthält verschiedene mutmaßliche Smad-Bindungselemente [28]. Die Transkriptionsregulation von NOX4 durch TGF- β ist SMAD3-abhängig, basierend auf der Wirkung von SMAD3-bedingter NOX4-Promotoraktivität [36]. Andere Mechanismen, wie epigenetische Modifikationen regulatorischer Domänen im NOX4-Promotor, können jedoch nicht ausgeschlossen werden [28]. Letztlich zeigen Studien, dass die Expression von NOX4 beim Menschen mit veränderten Parametern des Knochenstoffwechsels verbunden ist [39].

1.4.2 Rolle der NADPH-Oxidasen in der Zellmigration

Zellmigration ist ein Prozess, der eine Rolle bei der Embryonalentwicklung, Wundheilung und -regeneration, Entzündungen und Immunreaktionen sowie bei der Metastasierung maligner Tumoren spielt [73]. Es wird zunehmend klar, dass ROS Schlüsselmodulatoren der zellulären Signalübertragung sind. Dieses Konzept beinhaltet jedoch präzise gesteuerte ROS-Generatoren, und einige dieser Generatoren sind NOX-Proteine [39]. Die Signalübertragung bei der Migration und Adhäsion hängt auch von ROS ab, welches von NOX-Enzymen und Faktoren erzeugt wird [12]. NADPH-Oxidasen produzieren $\bullet\text{O}_2^-$ oder Wasserstoffperoxid im extrazellulären oder luminalen Raum [105]. Die Mechanismen des Transfers von extrazellulärem oder luminal erzeugtem Superoxid oder Wasserstoffperoxid in Zellen

Einleitung

sind seit langem untersucht worden, es gibt jedoch keine genauen Daten darüber, wie dies während der Migration und der Zelladhäsion geschieht. Möglicherweise erfolgt dieser Vorgang durch passive Diffusion oder regulierte Aufnahme [9]. Spätere Daten zeigen jedoch, dass einige Membrane für H_2O_2 schlecht durchlässig sind und dass ihr Transport durch Proteine des Aquaporin-Kanals reguliert werden kann, der auch den NO-Transport reguliert [106, 112]. Sobald es in der Zelle ist, kann das durch NADPH-Oxidasen erzeugte Wasserstoffperoxid als ein Redoxsignal wirken, indem es zyklische Übergänge zwischen oxidierten und reduzierten Formen von Cysteinresten verursacht [9, 106]. Die SH-Gruppe von Cystein ist ein hochreaktiver Teil von Proteinen und kontrolliert verschiedene Radikalformen, einschließlich derer von H_2O_2 [9]. Die Spezifität der intrazellulären ROS-vermittelten Signalübertragung kann auch durch die Nähe von Zielproteinen zum Ort der Wasserstoffperoxidbildung bestimmt werden [107, 122]. Darüber hinaus kann sich Wasserstoffperoxid in der Zelle frei bewegen und längere Zeit darin verbleiben. NOX-abgeleitete ROSs fungieren als sekundäre Botenstoffe, die Signalproteine, die an der Adhäsion und Migration beteiligt sind, spezifisch zu modifizieren [12].

Wie die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren NADPH-Oxidasen zur Erzeugung von ROS während der Zellmigration auslöst, ist nicht vollständig klar [9]. Einzelne Proteinziele des NOX-vermittelten Redoxsignalings, wie zum Beispiel Proteintyrosinphosphatase (PTP), Proteinkinasen, Zytoskelettproteine und Transkriptionsfaktoren wurden in verschiedenen Zelltypen und Geweben identifiziert [12].

Adhäsion und Migration, die durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren induziert werden, sind gut organisierte Prozesse in der zellulären Motilität [12]. Zusätzlich dazu, dass es in migrierenden Zellen wirkt, vermitteln Veränderungen von ROS Spiegeln in nicht-migrierenden Zellen Stimuli an das umgebende Gewebe welche es erlauben, dass bewegliche Zellen an das Gewebe zu binden [9]. Ergänzend zu den beschriebenen Wirkungen von ROS auf Endothelzellen, die das Migrationsverhalten von Immunzellen beeinflussen [9], haben neue Studien gezeigt, dass ROS auch in anderen Arten von nicht migrierenden Zellen, wie zum Beispiel humanen Mammafibroblasten (RMF-EG) wirken und die Migration einer schwach invasiven Epithelzelllinie (MCF-7) stimulieren [108].

Frühere Berichte deuten darauf hin, dass in vielen Zelltypen, einschließlich Herzfibroblasten, Hepatozyten, glatten Muskelzellen der Lunge und der

Einleitung

Lungenarterien, TGF- β eine erhöhte Expression von Nox4 induziert [36, 124]. NOX4 wurde mit der EMT-Genregulation und Migration anderer Zelltypen in Verbindung gebracht (siehe Abbildung 3). Es wurde auch berichtet, dass NOX4 eine migrationsfördernde Wirkung auf Angiotensin-II-behandelte vaskuläre Myofibroblasten hat [siehe Übersichtsarbeit 36]. Im Gefäßsystem tragen NOX-abgeleitete ROS zur Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus bei und regulieren wichtige Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Zytoskelett-Organisation und Zellmigration [124]. Die Expression von NOX4 im Endothel verstärkt die Vasodilatation und senkt den basalen Blutdruck, was durch eine Zunahme der H₂O₂-Produktion und eine Abnahme der NO-Inaktivierung erklärt werden kann [112]. Unter pathologischen Bedingungen induziert aber eine übermäßige NOX-abhängige ROS-Bildung, eine Dysregulation der Redox-Kontrollsysteme und fördert eine oxidative Schädigung der kardiovaskulären Zellen [13].

Sobald das Redox-Signaling endet, arbeiten biologische Prozesse, um den Effekt des Signals umzukehren und das System in seinen Ausgangszustand zurückzuführen. Zellen haben ein Schutzsystem gegen die schädlichen Wirkungen von Oxidationsmitteln, zu denen antioxidative Enzyme wie Katalase, Glutathionperoxidase und Peroxyredoxin gehören, sowie organische Verbindungen, die keine enzymatische Aktivität aufweisen, jedoch in der Lage sind, Wasserstoffperoxid abzubauen und das Signal schnell zu beenden [9, 122]. Es ist bemerkenswert, dass die einzelnen Elemente des Antioxidanssystems in der Zelle auf komplexe Weise funktionieren und häufig die gegenseitigen Wirkungen verstärken. Isoform-spezifische NOX-Inhibitoren werden entwickelt, um die ROS-abhängige Komponente von Migration und Adhäsion zu modulieren. Diese Verbindungen könnten geeignet sein, unterschiedliche Effekte zwischen pathophysiologischer und physiologischer Adhäsion und Migration auszulösen [12].

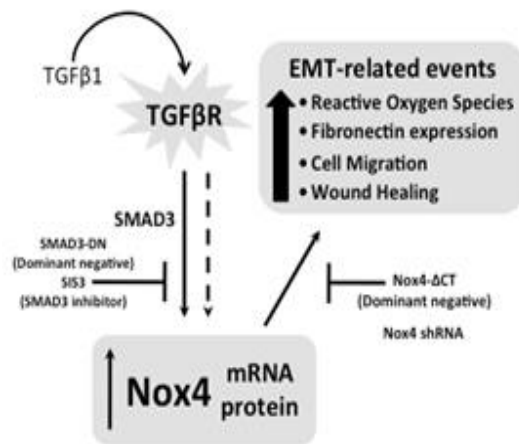


Abbildung 3: NOX4 moduliert TGF-β bedingte Zellmigration.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3448829/figure/F7/> abgerufen am 10.03.18

1.4.3 Inhibitoren von NADPH-Oxidasen

Die Verwendung spezifischer Inhibitoren von NOXs wird sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als ein wichtiges Werkzeug angesehen, um zu überprüfen, ob diese Enzyme an irgendeinem physiopathologischen Ereignis beteiligt sind [46, 126]. Mehrere Inhibitoren gegen NOX, darunter Diphenyleniodonium (DPI), Staurosporin, Aminoimidazolcarboxamid-Ribonukleotid und Apocynin, werden in der Literatur beschrieben [47].

Apocynin wurde bereits in den frühen 1980er Jahren als NADPH-Oxidase-Inhibitor charakterisiert [43]. Das aromatische Keton 4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon (Trivialnamen: Apocynin, Acetovanillon) ist ein ortho-methoxysubstituiertes Catechol, Bestandteil von Wurzelextrakten des Heilkrauts *Picrorhiza kurroa*, das im Himalaya wächst [46]. Heutzutage ist Apocynin jedoch eine kostengünstige Substanz und kann kommerziell von mehreren Firmen bezogen werden, was die breite Anwendung dieser relativ ungiftigen Phytochemikalie erleichtert [48].

Eine sehr wichtige Erkenntnis in Bezug auf den Mechanismus der NOX-Hemmung war die Entdeckung, dass Apocynin ein Prodrug ist [48, 125, 126], das zwei verschiedene Stoffwechselwege durchlaufen kann [126]. In aktivierten Phagozyten unterliegt Apocynin einer oxidativen Dimerisierung durch Myeloperoxidasen (MPO), unter Bildung von Diapocynin, das vermutlich die aktive Einheit ist, die das Enzym hemmt [125, 126]. Ein alternativer Weg besteht darin, ein temporäres prooxidierendes Apocynin-Radikal zu erzeugen [126]. Apocynin wird durch H₂O₂ und MPO aktiviert, um ein Apocynin-Radikal zu bilden, das Thiole im NOX oxidiert [125].

Einleitung

Auf diesem Weg kann Apocynin die NADPH-Oxidase-Aktivierung blockieren, da Thiole entscheidend für die Funktion der p47phox-a-Untereinheit von NOX sind und essentiell für die anfängliche Aktivierung durch Phosphorylierung sind [47].

Tatsächlich wirkt Apocynin nicht als kompetitiver Inhibitor für Substrat- oder Kofaktoren an irgendeiner der NADPH-Oxidase-Untereinheiten, sondern stört eher den Zusammenbau der Oxidase, der für die Aktivierung benötigt wird [43]. Apocynin verhindert die Translokation der cytosolischen Komponente p47phox zu NOX2 in Leukozyten, Monozyten und Endothelzellen [43, 125]. Mehrere Berichte haben gezeigt, dass Apocynin auch die Expression von NOX-Komponenten wie p67-phox und gp91-phox inhibiert [48, 100, 101, 126].

Es wurde jedoch auch beobachtet, dass Apocynin die NOX-Aktivität in Zellen hemmt, die Isoformen exprimieren, die sich von NOX2 unterscheiden. Zum Beispiel inhibierte Apocynin die ROS-Produktion in humanen glatten Muskelzellen der Aorta und in menschlichen Fibroblasten: In beiden Zellmodellen war die NOX-Aktivität abhängig von der NOX4-Expression [46].

Darüber hinaus hatte ein früherer Bericht gezeigt, dass Apocynin auch als potentes Antioxidans wirkt, welches ROS abfangen kann [47].

Für nichtradikale Oxidationsmittel wie HOCl und H₂O₂ hat Apocynin eine hohe Kapazität als Radikalfänger, was einen zusätzlichen Weg für seine biologischen Wirkungen darstellt [48]. Diese Eigenschaft von Apocynin gewinnt besondere Bedeutung in Bezug auf NOX4, die NADPH-Oxidase-Isoform, die hauptsächlich H₂O₂ anstelle des Superoxidanions produziert [48, 99].

Gegenwärtig ist Apocynin der am meisten verwendete Inhibitor von NOX [126]. Allerdings übt Apocynin auch viele andere pharmakologische Wirkungen aus, die nicht direkt mit der Hemmung von NOX zusammenhängen [48]. Apocynin hemmte auch die Expression der induzierbaren Cyclooxygenase (Cox2) in menschlichen Makrophagen über einen zumindest teilweise NOX-unabhängigen Mechanismus [46].

Es wurde postuliert, dass die inhibierende Wirkung von Apocynin auf Zytoskelett-Umlagerungen und Zellmigration im Anschluss an die Arzneimitteloxidation durch Peroxidasen erfolgt, wodurch oligophenolische und quinonartige Verbindungen erhalten werden [46]. Diese Apocyninderivate können nicht nur NOX hemmen, sondern auch das kleine G-Protein Rac1, das auch die Zellmigration kontrolliert [46, 102]. Es wurde bisher kein Beweis gegeben, dass die NOX-Hemmung tatsächlich mit

Einleitung

der Wirkung von Apocyninderivaten auf die Zellmigration in Verbindung gebracht werden kann. Aldieri *et al.* haben bestätigt, dass Apocinin auch den ROS-Spiegel über den NOX-unabhängigen Mechanismus verringern können [46].

Die Wirkung von Apocynin wird durch Diphenyliodinium (DPI), einen nicht absorbierenden NADPH-Oxidase-Inhibitor, gehemmt [45].

Kürzlich wurden neue potentielle NOX-Inhibitoren vorgeschlagen, wie die synthetischen Verbindungen VAS2870 und S17834, das natürlich vorkommende antibiotische Peptid PR-39 und das Peptid gp91ds-tat. Die Kenntnis der Pharmakokinetik von gp91ds-tat ist begrenzt, und weitere pharmakologische Studien müssen *in vivo* abgeschlossen werden [46].

2. Ziele der Arbeit

Zellmigration und Adhäsion sind entscheidend sowohl für die Entwicklung von Organismen beim Übergang vom Embryo zum Erwachsenen und für die Homöostase von adulten Geweben als auch tragen zur Pathologie von Krankheiten bei. ROS, insbesondere Wasserstoffperoxid, und die Proteine, die sie regulieren, sind bei der Migration und Adhäsion von Zellen von Bedeutung. Frühe Hinweise darauf, dass ROS eine Rolle in Zellen spielen könnte, um ihre Migration zu fördern, kamen aus *in vitro* Studien, die zeigten, dass die Behandlung von endothelialen Zellen, Neutrophilen, Fibroblasten und vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) mit ROS-abbauenden Enzymen die Migration dieser Zellen zu Wachstumsfaktoren und Chemokinen unterdrückt [9]. Von mehreren ROS-Quellen im Knochensystem scheint NOX4 die Hauptquelle für Wasserstoffperoxid zu sein.

Mehr und mehr Studien deuten darauf hin, dass TGF- β eine hauptsächliche Bedeutung bei der Knochenbildung, der Mineralspeicherung und der Bildung hämatopoetischer Zellen hat [42, 151] und als starker Induktor der Nox4-Expression identifiziert wurde [38].

Diese Arbeit zielt darauf ab, die Auswirkungen von TGF- β durch NOX4 und drauffolgende Akkumulation von ROS auf primären humanen Osteoblasten hinsichtlich ihrer Migration zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit zu beantwortenden Fragen sind:

- Wird die Expression von NOX4 durch TGF- β 1 induziert?
- Führt es zur Anhäufung von ROS?
- Ist TGF- β 1 an der Regulation des Osteoblastenwachstums durch NOX4 beteiligt?
- Beeinflusst NOX4 Migration oder Proliferation der Osteoblasten?
 - Führt die TGF- β 1-induzierte NOX4-Expression zur Aktivierung von Proliferationsmarkern (z.B. Ki67 / PCNA) in Osteoblasten?
 - Aktiviert TGF- β 1 durch NOX4-Expression das Signal der Focal Adhesion Kinase (FAK) in Osteoblasten?
 - Wird unter der Einwirkung von TGF- β 1 auf Expression von NOX4 einen Anstieg von Vimentin in Osteoblasten beobachtet?

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalienliste

Name	Hersteller
Agarose Standard Carl Roth	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alizarin Red S	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammonium Persulfate	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Antibiotikum/Antimycotikum (100 X)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Brom Phenol Blau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
cDNA Synthese Kit	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Cetylpyridiumchlorid monohydrate	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Collagenase II	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
dd H ₂ O	Apotheke UKT, Tübingen, Deutschland
Deoxycholic acid (DOC)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNase I, RNase-free	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Essigsäure	VWR, Bruchsal, Deutschland
Ethanol 99 %	Apotheke UKT, Tübingen, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Folin's Reagent	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Formaldehyd Lösung (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol (10 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ham's F12	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Hepes	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Isopropanol, 99,8 %	Honeywell, Albstadt, Deutschland

Materialien und Methoden

Kapa Fast Ready Mix	Peqlab, Erlangen, Deutschland
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Leupeptin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MEM Earle's	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodium Fluorid (NaF)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge (2 M NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumnatriumtartrat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Kochsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kupfersulfat pentahydrat (CuSO ₄ *5H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrocellulose membran	Biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland
4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
4-Nitrophenol solution 10 mM	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
PBS	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
p-Cumarsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
peqGOLD TriFast	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Resazurin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Roti-Mark BICOLOR	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamidgel - Lösung)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodium Orthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
TEMED, 99 % p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tergitol-Lösung (NP40 Ersatz)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Tris-Base (Trizma)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Triton-x-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau 0,5 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland,
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Whatman Papier	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialliste

Name	Hersteller
Handschuhe	Paul Hartmann, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Hohlmeißelzange, steril	BG Unfallklinik, Tübingen, Deutschland
Kryoröhrchen	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Multiwellplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	SARSTEDT, Nümbrecht Deutschland
Pipette Research plus 2,5 µl; 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	SARSTEDT, Nümbrecht Deutschland
Plastikküvetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht Deutschland
Safe-lock Tubes 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml	Carl Roth, SARSTEDT, Karlsruhe, Nümbrecht Deutschland
Sterilfilter (0,22 µm)	SARSTEDT, Nümbrecht Deutschland
Zellkulturflasche Cell star T125, T175	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschale 10 cm ² , 25 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber, steril	Corning Incorporated, Kaiserslautern, Deutschland

3.1.3 Verwendete Geräte

Tabelle 3: Geräteliste

Gerät	Hersteller
Abzug Secuflow 1200	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
CO ₂ -Inkubator C-150	BINDER, Tuttlingen, Deutschland
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Hercules, USA
Feinwaage	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Gefrierschrank -20° C	Liebherr, Kirchberg an der Iller, Deutschland
Gefrierschrank -80° C	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Kühlager +4° C	Liebherr, Kirchberg an der Iller, Deutschland
Mikroskop Primo Vert	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle 700 Watt	SEVERIN Elektrogeräte, Sundern, Deutschland
Rotiphorese PROclamp MINI System	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Sterilbank	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Spektralphotometer Omega plate-reader	FluoStar Omega BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Vortex Mixer	Corning LSE, Corning, USA
Wasserbad Aqualine AL 25	LAUDA, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifugen Heraeus	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland

3.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörperliste

Name	Molekulargewicht	Hersteller
Alexa Fluor markierte sekundäre Antikörper (AK)		Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
pFAK anti-human AK (Kaninchen)	125 kDa	Santa Cruz Biotech, Dallas, Texas, USA
NOX4 anti-human AK (Ziege IgG)	70 kDa	Santa Cruz Biotech, Dallas, Texas, USA
PCNA anti-human AK (Kaninchen IgG)	29 kDa	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
phospho-FAK anti-human AK (Kaninchen IgG)	125 kDa	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
p-53 anti-human AK (Kaninchen)	53 kDa	Santa Cruz Biotech, Dallas Texas, USA
Vimentin anti-human AK (Kaninchen IgG)	57 kDa	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Sekundäre AK (Ziege)		Santa Cruz Biotech, Dallas Texas, USA

3.1.5 Lösungen und Puffer

Die im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer wurden in Übereinstimmung mit den Standard Operating Procedures (SOPs) des Siegfried Weller Instituts für unfallmedizinische Forschung zustande gebracht [152].

Tabelle 5: Liste der verwendeten Lösungen für Isolierung und Kultivierung von primären humanen Osteoblasten

Lösung/Puffer	Bestandteile	Konzentration
β -Glycerol-Phosphat-Stammlösung	108 mg β -Glycerol-Phosphat in 10 ml DPBS gelöst steril filtrieren aliquotieren Lagerung bei -20°C	50 nM

Materialien und Methoden

Dexamethason-Stocklösung	3 mg Dexamethason in 50 ml PBS Lagerung bei -20°C	100 mM
HEPES-Stocklösung	2,9 g HEPES in 10ml DMEM/Ham's-F12 Immer frisch ansetzen	25 mM
Kollagenase II Lösung	0,7 mg Kollagenase II 1ml PBS Immer frisch ansetzen	0,07 %
L-Ascorbat-2-Phosphat-Stammlösung	128 mg L-Ascorbat-2-Phosphat in 10 ml PBS steril filtrieren aliquotieren Lagerung bei -20°C	50 nM
Trypanblaulösung	0,75 ml Trypanblau 0,5 % 2,25 ml PBS	0,125 %

Tabelle 6: Liste der verwendeten Lösungen für Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Lösung/Puffer	Bestandteile	Konzentration
Agarose-Gel	1,8 g Agarose 100 ml TBE-Puffer Erwärmen in der Mikrowelle bis die Agarose gelöst ist 7 µl Ethidiumbromid	1,8 %
Ethanol 70 %	35 ml Ethanol 99 % 15 ml ddH ₂ O	70 %
PCR Ladepuffer (5x)	25 mg Bromphenolblau in 5 ml 10X TBE 5 ml Glycerol (10 %) 20 ml H ₂ O ₂ Lagerung bei -20°C	
TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) (1x)	10 ml 10X TBE 90 ml ddH ₂ O	
TBE (10x)	540 g TRIS (0,89 M) 275 g Borsäure (0,89 M) 37,3 g EDTA (20 mM) 5 L ddH ₂ O auf pH = 8,3 kalibrieren	

Tabelle 7: Liste der verwendeten Lösungen für ROS-Messung

Lösung/Puffer	Bestandteile	Konzentration
APS-Lösung	2 g Ammonium Persulfat 20 ml ddH ₂ O aliquotieren Lagerung bei -20°C nicht wieder auftauen	10 %
DCFH-DA Gebrauchslösung	0,5 µl DCFH-DA Stammlösung in 10 ml FCS-Medium Immer frisch ansetzen	10 µM

DCFH-DA Stammlösung	100 mg DCFH-DA in 10,26 ml DMSO Lagerung bei -20°C	20 mM
------------------------	---	-------

Tabelle 8: Liste der verwendeten Lösungen für Western Blot

Lösung/Puffer	Bestandteile	Konzentration
BSA-Blocking Puffer	0,5 g BSA 50 ml DPBS schäumt beim Mischen stark auf Lagerung bei +4 oder -20°C	1 %
BSA-Stocklösung	50 mg BSA 5 ml ddH ₂ O	10 µg/µl
ECL-Lösung	2,5 ml Lösung A 2,5 ml Lösung B Sofort nach dem Mischung verwenden (nur für 30 min stabil)	
ECL Lösung A	2,5 ml 100 mM TRIS (pH = 8,5) 25 µl 250 mM Luminol-Stocklösung 11 µl 90 mM p-Cumarinsäure- Stocklösung Immer frisch ansetzen	2,5 mM 0,4 mM
ECL Lösung B	2,5 ml 100 mM TRIS (pH= 8,5) 3-5 µl 30 % H ₂ O ₂ -Lösung Immer frisch ansetzen	~ 0,06 %
Elektrophorese Puffer (1x)	200 ml Electrophorese Puffer (5x) 800 ml ddH ₂ O Lagerung bei +4°C Puffer kann 4-5 mal verwendet werden	1x
Elektrophorese Puffer (5x)	75 g Glycin 15,17 g TRIS 5 g SDS Gesamtvolumen auf 1 L mit ddH ₂ O einstellen Auf +37°C beim Niederschlag erwärmen	1 M 125 mM 0,5 %
Essigsäure-Lösung 1%	1 ml Essigsäure 100 % Gesamtvolumen auf 100 ml mit ddH ₂ O einstellen Lagerung bei RT	1 %
Kupfersulfat- Stocklösung	1 g CuSO ₄ *5H ₂ O 100 ml ddH ₂ O Lagerung in der braunen Flasche bei RT	1 %
Leupeptin- Stocklösung	2,5 mg Leupeptin 1 ml dH ₂ O aliquotieren (je 5 ml) Lagerung bei -20°C nicht wieder auftauen	2,5 mg/ml
Lowry Lösung A	20 µl Na-K-Tartrat Stocklösung 20 µl CuSO ₄ -Stocklösung	

Materialien und Methoden

	zum Gesamtvolumen von 2 ml mit Na ₂ CO ₃ -Stocklösung bringen Immer frisch ansetzen	
Lowry Lösung B	500 µl Folin Reagenz 1000 µl ddH ₂ O Immer frisch ansetzen	33 %
Lämmli Running Puffer (5X)	6 ml 1M TRIS (pH = 6,8) 10 ml 99 % Glycerol 200 µl 500 mM EDTA 2 g SDS 10 mg Bromphenol Blau 2,5 ml 2-Mercaptoethanol Volumen auf 20 ml mit ddH ₂ O einstellen aliquotieren (0,5 - 1 ml) Lagerung bei -20°C	300 mM 50 % 5 mM 10 % 0,05 % 12,5 %
Luminol-Stocklösung	0,88 g Luminol 20 ml DMSO aliquotieren (von 200 µl) Lagerung bei -20°C	250 mM
Milch Blocking Puffer	2,5 g Magermilchpulver 50 ml TBS-T Waschpuffer Lagerung bei + 4 oder -20°C	5 %
NaF-Stocklösung	104 mg NaF 1 ml dH ₂ O aliquotieren (je 5 ml) Lagerung bei -20°C nicht wieder auftauen	2,5 M
Na-K-Tartrat-Stocklösung	2 g Na-K-Tartrat 100 ml ddH ₂ O Lagerung in einer braunen Flasche bei RT	2 %
NaOH	100 ml 2 M NaOH 900 ml ddH ₂ O Lagerung bei RT	200 mM
Na ₃ VO ₄ Stocklösung	90 mg Na ₃ VO ₄ 1 ml dH ₂ O ₂ mit HCl auf pH = 9,0 einstellen, dann bis zur Farblosigkeit kochen, abdecken, auf RT abkühlen diesen Zyklus wiederholen, bis die Lösung nach dem Kochen und Abkühlen auf pH = 9,0 bleibt zum Anfangsvolumen mit Wasser bringen aliquotieren Lagerung bei -20°C verwerfen wenn Aliquot gelb wird	0,5 M
90 mM p-Cumarinsäure-Stocklösung	0,15 p-Cumarinsäure 10 ml DMSO aliquotieren (je 90 µl)	90 mM

Materialien und Methoden

	Lagerung bei -20°C	
Pepstatin A-Stocklösung	1 mg Pepstatin A 2 ml Methanol aliquotieren (je 5 - 10 ml) Lagerung bei -20°C	0,5 mg/ml
PMSF-Stocklösung	87,1 mg PMSF 1 ml dH ₂ O ₂ aliquotieren (je 5 - 10 ml) Lagerung bei -20°C nicht wieder auftauen	0,5 M
RIPA-Gebrauchslösung	500 µl RIPA-Stocklösung (500x) Protease- und Phosphataseinhibitoren 1 µl Pepstatin A- Stocklösung (500x) 1 µl Leupeptin- Stocklösung (500x) 1 µl PMSF- Stocklösung (500x) 1 µl NaF- Stocklösung (500x) 1 µl Na ₃ VO ₄ - Stocklösung (500x) Immer frisch auf Eis ansetzen	1x 0,1 %
Tank Puffer (5x)	15,17 g TRIS 75 g Glycin Volumen auf 1 l mit ddH ₂ O einstellen Lagerung bei +4°C	125 mM 1M
Tank Puffer (1x)	200 ml Tank Puffer (5x) 200 ml Methanol 600 ml ddH ₂ O Lagerung bei +4°C Puffer kann 4-5 mal verwendet werden	1x 20 %
TBS-T Waschpuffer	100 ml TBS 10x 10 ml 10 % Tween-20-Lösung 900 ml ddH ₂ O Lagerung bei RT	1x 0,1 %
10 mM ungepufferte TRIS-Lösung (pH = 10-10,5)	0,606 g TRIS-Base 500 ml mit ddH ₂ O Lagerung bei RT	10 mM
SDS - Lösung	2 g SDS 20 ml ddH ₂ O Lagerung bei RT	10 %
Tween-20-Lösung (10 %)	100 ml Tween-20 (100 % sehr dickflüssig) 900 ml ddH ₂ O Lagerung bei RT	10 %

Tabelle 9: Liste der verwendeten Lösungen für Immunfluoreszenzfärbung

Lösung/Puffer	Bestandteile	Konzentration
Formaldehyd-Lösung (2 %)	6 ml 37 % Formaldehyd-Lösung 94 ml DPBS Lagerung bei RT im Abzug	2 %
Formaldehyd-Lösung (4 %)	12 ml 37 % Formaldehyd-Lösung 88 ml DPBS	4 %

	Lagerung bei RT im Abzug	
Hoechst-Stocklösung	10 mg Hoechst 33342 5 ml DMSO aliquotieren (5 - 10 ml) Lagerung bei -20°C	2 µg/µl
Triton-X-100-Lösung (0,1 %)	50 µl Triton-X-100-Lösung (100 % sehr dickflüssig) 50 ml ddH ₂ O schäumt beim Mischen stark auf Lagerung bei RT	0,1 %

3.1.6 Software

Tabelle 10: Softwareliste

Software	Hersteller
MS Excel	Microsoft Office Home and Student 2010, Redmond WA, USA
Image J 1.48	National Institute of Health, USA
Intas Image Software	Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
NCBI Primer-BLAST	National Center for Biotechnology Information, USA
OMEGA Plate Reader Software	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland

3.2 Methoden

Während der Durchführung der Arbeit wurden moderne biochemische, molekularbiologische und physiologische Untersuchungsmethoden verwendet, die nach SOPs des Siegfried Weller-Instituts der Universität Tübingen durchgeführt wurden. Alle Arbeitsschritte in der Zellkultur wurden in der sterilen Werkbank durchgeführt.

3.2.1 Isolierung und Kultivierung von primären humanen

Osteoblasten

Die Isolierung und Kultivierung der primären humanen Osteoblasten erfolgte nach Ehnert et al. 2010 [11, 152].

3.2.1.1 Herstellung von Zellkulturmedien

Herstellung von Osteoblastenkulturmedium

Um 1 Fläschchen des Osteoblastenkulturmediums nach SOP # 19A herzustellen, wurden jeweils 250 ml MEM Earle´s und Ham´s F12 gründlich miteinander vermischt. Zu dem so erhaltenen Medium wurden 50 ml FCS, 5 ml einer Lösung von Penicillin / Streptomycin und je 0,5 ml L-Ascorbat-2-Phosphat-Stocklösung und β-

Glycerolphosphat-Stocklösung zugegeben. Anschließend wurde das Medium durch Schwenken gemischt [11].

Herstellung von Osteoblastendifferenzierungsmedium

Nach SOP # 19B wurden jeweils 250 ml MEM Earle's und Ham F12 gründlich miteinander vermischt. 29 mg L-Ascorbat-2-Phosphat (200 µM), 1,08 mg β-Glycerol-Phosphat (10 mM), 2,98 g Hepes (25mM), 83 mg Kalziumchlorid (1,5 mM) und 10 µl Dexamethason-Stocklösung wurden in dem erhaltenen Medium gelöst und dann in die Mediumflasche steril filtriert. Anschließend wurden 5 ml FCS und 5 ml Penicillin/Streptomycin Lösung hinzusetzt und alles durch Schwenken vermischt [152]. Beide Medien können 3 Wochen bei einer Temperatur von +4°C gelagert werden.

3.2.1.2 Isolierung von primären humanen Osteoblasten

Zur Durchführung dieser Arbeit wurden primäre humane Osteoblasten aus Knochenfragmenten verwendet, die bei den Operationen mit Totalhüftarthroplastik in der BG Tübingen Unfallklinik gewonnen wurden. Die Knochenentnahme erfolgte gemäß dem positiven Ethikvotum (364 / 2012BO2) der Medizinischen Fakultät Tübingen nach schriftlicher präoperativer Zustimmung der Patienten.

Alle Manipulationen mit der Knochenstruktur wurden in einer Sterilbank unter Verwendung von sterilen Werkzeugen und Handschuhen und unter Einhaltung der Sicherheitsstandards nach SOP # 19A durchgeführt.

Die kleinen Fragmente des spongiösen Knochens wurden mittels der Lyer-Zange aus dem Femurkopf entfernt. Das so erhaltene Material wurde in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und 2-3 Mal mit DPBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Osteoblasten mit Hilfe einer Kollagenaselösung (1 ml Lösung pro 1 ml Knochenfragment) aus dem Knochenmaterial gelöst. Nach einer Inkubation von 1-1,5 Stunden bei +37°C unter wiederholtem Durchmischen in einem Wasserbad wurde der Überstand in ein neues 50 ml Falcon überführt. Die Knochenfragmente wurden 2 Mal mit DPBS gewaschen und der enthaltene Überstand wurde dem 50 ml Falcon zugegeben. Dieses Falcon wurde 10 Minuten bei 600 U / min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und das entstandene Pellet mit ca. 5 ml des erwärmten Osteoblastenkulturmediums resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde aus dem Falcon in eine T175 Gewebekulturflasche überführt, in die 20 ml Osteoblastenkulturmedium sowie 125 µl Antibiotikum/Antimycotikum zugegeben wurden [152]. Die Zellen mussten bei +37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert

werden. Am nächsten Tag wurde Zelladhäsion überprüft und das Osteoblastenkulturmedium unter wiederholter Zugabe von 125 µl Antibiotikum/Antimycotikum gewechselt.

3.2.1.3 Kultivierung und Passagieren von primären humanen Osteoblasten

Frisch isolierte Zellen, bezeichnete als Passage 0, erhielten alle 3-5 Tage eine Erneuerung des Kulturmediums. Dafür wurde das alte Medium aus den Zellkulturflaschen durch Absaugen entfernt und mit neuem Medium ersetzt. Die Zellen wurden nur dann passagiert, wenn die Zelldichte etwa 90 % betrug, das heißt, dass etwa 90 % der Fläche der Gewebekulturflasche mit Osteoblasten bedeckt war, was mit einem Lichtmikroskop kontrolliert wurde [152].

Um eine homogenere Osteoblastenkultur ohne mögliche Spongiosa- oder Fettreste zu erhalten und die Anzahl der Osteoblasten zu erhöhen, müssen die Zellen mehrmals passagiert werden.

Zuerst wurden Trypsin / EDTA, Osteoblastenkulturmedium und DPBS in einem Wasserbad auf +37°C aufgewärmt [152]. Unter der Sterilbank wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit DPBS gespült. Nach Absaugen des DPBS wurden 2 ml Trypsin / EDTA in die Kulturflasche gegeben [149], und die Zellen wurden für ca. 10 Minuten bei 5 % CO₂ und +37°C inkubiert [152]. Durch leichtes Klopfen auf den Kulturkolben wurden die Zellen gelöst, was mit einem Lichtmikroskop kontrolliert wurde. Das Osteoblastenkulturmedium, welches Trypsin inhibierendes FCS enthält, wurde zu den Zellkulturflaschen hinzugegeben, und die so entstandene Suspension wurde wiederholt gemischt, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellsuspension wurde dann in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und 10 Minuten bei 600 U / min und RT zentrifugiert [152].

Als Ergebnis der Zentrifugation setzten sich die Osteoblasten auf dem Boden des Gefäßes ab. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde in 10 ml Osteoblastenkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden aus einer Kulturflasche in zwei bis drei neue T175-Kulturflaschen ausplattiert [152]. Dabei wurden zu jeder Kulturflasche 25 ml Kulturmedium zugegeben und erneut im Inkubator bei +37°C und 5 % CO₂ inkubiert [151].

3.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Um die Anzahl der lebensfähigen Zellen zu bestimmen, wurde eine Trypanblau-Lösung verwendet, die durch die beschädigte Membran in die Zelle eindringt und an

ihre Proteine bindet, wodurch die Zelle in Blau gefärbt wird. Lebensfähige Zellen lassen sich nicht anfärben. Für diese Methode wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet, die wie das Deckglas zuvor mit 70 % Ethanol gereinigt wurde. Die Zellsuspension wurde dann in einem 1:1-Verhältnis mit der Trypanblau-Lösung gemischt [155], wonach 10 µl der resultierenden Mischung in die Zählkammer überführt wurden. Die Anzahl der Zellen in den vier Quadraten wurden unter dem Mikroskop gezählt. Die durchschnittliche Zellzahl wird mit 10.000 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Anzahl der Zellen pro ml zu erhalten.

3.2.2 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Da die Hauptforschungsfrage darin bestand, die Wirkung von TGF- β auf oxidative Stressreaktionen in menschlichen Osteoblasten zu bestimmen, wurde die Genexpression in TGF- β 1-stimulierten Osteoblasten untersucht [152]. Dafür wurde humaner oxidativer Stress Plus RT² eingesetzt, der nicht nur die Expression von 84 mit oxidativem Stress assoziierten Genen beschreibt, sondern auch das Aktivitätsniveau des oxidativen Stressweges in experimentellen Proben als erhöht oder unverändert bestimmt. Dazu ist in der Zelle enthaltene Ribonukleinsäure (RNA) isoliert, in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) transkribiert und mittels RT-PCR quantifiziert worden. [49, 152].

3.2.2.1 RNA-Isolation

Zur Vorbereitung der RT-PCR war es notwendig, die RNA der in Zellkulturflaschen wachsenden Zellen nach SOP # 64A zu isolieren. Dazu wurde PeqGOLD TriFast eingesetzt [152]. Das Kulturmedium wurde entfernt und 500 µl TriFast pro 25 ml Zellkulturflasche für 5 Minuten bei RT zugegeben. Die entstandene Suspension wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß übertragen. Anschließend wurden 100 µl Chloroform zugegeben, gründlich gemischt und dann bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Durch die anschließende zehninütige Zentrifugation der Zellsuspension bei +4°C und 14.000 g entstand eine Phasentrennung. Die Gesamt-RNA war in der oberen wässrigen Phase gelöst, während sich der größte Teil der DNA und Proteine entweder in der Interphase, oder in der organischen Phase befanden. Die Gesamt-RNA wurde anschließend durch Ausfällung mit Isopropanol isoliert [53]. Dazu wurde die obere RNA-haltige Phase in ein mit 250 µl Isopropanol gefülltes Eppendorf-Gefäß überführt, gründlich durchgemischt und 10 min auf Eis inkubiert [152]. Die erneute Zentrifugation, die unter den oben beschriebenen

Bedingungen durchgeführt wurde, führte zur Bildung von Isopropanol-Überstand. Nach der Beseitigung des Überstands wurde das RNA-Pellet zweimal mit 1 ml 70 %igem Ethanol gespült und erneut für 10 Minuten bei +4°C und 14.000 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde das Eppendorf-Gefäß für einige Minuten offen gelassen, um das verbleibende Ethanol zu verdampfen. Der RNA-Niederschlag wurde dann in 30 µl DEPC H₂O resuspendiert. Die so gewonnene RNA wurde bei -80°C im Gefrierschrank bis zum Gebrauch gelagert [152].

3.2.2.2 Konzentration, Reinheit und Integrität der RNA

Die quantitative Analyse und Bestimmung der RNA-Reinheit wurde auf der Basis der optischen Dichte unter Verwendung eines UV-Spektrophotometers nach SOP # 64B durchgeführt. Das Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung basiert auf der Existenz eines maximalen Absorptionsvermögens von DNA und RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dies bedeutet, dass in den Nukleinsäurelösungen die maximale photometrische Absorption bei 260 nm beobachtet wird und direkt mit der Konzentration von DNA oder RNA korreliert. Der gemessene Wert von 1 bedeutet, dass die Lösung ungefähr 40 µg/ml RNA enthält [152].

2 µl DEPC H₂O wurden zu jeder Vertiefung der Messplatte pipettiert und die Extinktion wurde bei 260 nm und 280 nm vermessen. Anschließend wurden diese Blindwerte für die Verrechnung mit den Werten den Proben verwendet. Der nächste Schritt bestand darin, 2 µl unverdünnte RNA-Proben in jede Vertiefung zu geben und die Extinktion erneut wie oben beschrieben zu messen. Das Spektrophotometer zeigt direkt die Konzentration der RNA in Suspension in µg/µl an.

Das Absorptionsverhältnis bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm zeigt die Reinheit der RNA. Das Material gilt als rein, wenn das Verhältnis von 260 nm / 280 nm für RNA etwa 2,0 beträgt. Im Fall von kleineren Werten von 260 nm / 280 nm enthält die Probe Verunreinigungen, die nach dem RNA-Isolierungsverfahren verbleiben und eine signifikante Absorption bei 280 nm aufweisen [53].

Die Integritätskontrolle der RNA wurde mittels Gelelektrophorese nach SOP # 64C durchgeführt. Dieses Verfahren zum Nachweis von RNA-Integrität basiert auf der Verwendung von interkalierenden Substanzen, wie Ethidiumbromid, die ihre Fähigkeit zu Fluoreszenz aktivieren, als Folge der Bindung an RNA. Mit intakter RNA werden durch diese Fluoreszenz von Ethidiumbromid gut definierte 18S und 28S RNA-Banden im UV-Licht (GelDoc) visualisiert. Zur Herstellung von Agarosegel mit

einer Konzentration von 1,5 % sind nach SOP # 63 1,5 g Agarose in 100 ml 1 TBE gelöst, aufgeköcht und dann 7 µl Ethidiumbromid zugeben worden [152]. Die resultierende Mischung wurde in einen Gelschlitten gegossen, in den Steckkämme eingetaucht wurden, um nach dem Gelieren Geltaschen zu bilden. Nach der Gelabkühlung wurden die Steckkämme herausgeholt und das Gel in eine mit 1x TBE gefüllte Elektrophoresekammer übertragen.

Unter Verwendung von DEPC H₂O wurden 400 ng jeder RNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl verdünnt und 2,5 µl PCR-Ladepuffer 5x beigelegt.

In die erste Geltasche wurden 1,5 µl des pUC19-Markers pipettiert. In jeder nachfolgenden Kammer wurden 12 µl des Produkts gegeben. Die elektrophoretische Trennung wurde 50 Minuten lang bei einer Spannung von 90 V durchgeführt.

3.2.2.3 Synthese von komplementärer DNA

Reverse Transkription ist Übertragung von Information von RNA auf DNA, ein Prozess, der invers zur normalen Transkription ist und vom Enzym Reverse Transkriptase durchgeführt wird. Als Ergebnis der Arbeit der reversen Transkriptase wird komplementäre DNA gebildet [50, 53], die auf der Basis von zellulärer Matrix-RNA (mRNA) gebildet wird [53].

Dafür wurde das cDNA Synthese Kit von Thermo Scientific nach SOP # 65 genutzt [152]. Eine Mischung mit einem Gesamtvolumen von 11 µl bestehend aus RNA (von 1 µg bis 4 µg), Oligo (dT) und Random-Hexamer-Primer (jeweils 1 µl) hergestellt. Alle Proben wurden auf Eis aufgetaut und verarbeitet. Die Inkubation im Thermocycler wurde dann bei +65°C für 5 Minuten durchgeführt. Dann wurden die Proben schnell wieder auf das Eis übertragen.

Danach wurden den Proben je 9 µl Reaktionslösung (je Probe: 2 µl 10mM dNTP-Mix, 2 µl von M-MuLV reverse Transkriptase, 4 µl konzentriert fünffache Reaktionspuffer und 1 µl RNase-Inhibitor) zugegeben sodass das Gesamtvolumen jeder Proben 20 µl ergab. Wiederholte Inkubation im Thermocycler wurde bei +37°C für 60 Minuten durchgeführt. Die Synthese wurde gestoppt, indem die Temperatur für 5 Minuten auf +70°C erhöht wurde. Am Ende wurden die Proben mit DEPC H₂O auf eine für die PCR erforderliche cDNA-Konzentration von 5 ng/µl verdünnt und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.2.2.4 Konventionelle RT-PCR

Das Wesen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist die Amplifikation (Vermehrung) einer bestimmten DNA-Region. Die PCR basiert auf der üblichen biochemischen

Materialien und Methoden

Synthesereaktion, katalysiert durch das Enzym DNA-Polymerase. Die PCR ist ein Verfahren, das im Jahr 1985 eingeführt wurde [52] und welches aus sich wiederholenden Zyklen besteht, um die Produktion großer Mengen an Kopien eines bestimmten DNA-Fragments herzustellen [53].

Die Schlüsselkomponente der Reaktion sind neben der Taq-DNA-Polymerase kurze (20-30 Nukleotide) künstlich synthetisierte Oligonukleotide - Primer, komplementär zu den gewünschten Regionen an den äußeren Grenzen der Matrizen-DNA, welche eine Reihe wichtiger Funktionen bei der Durchführung der PCR erfüllen:

- 1) Primer sind der Ausgangspunkt für die Synthese einer neuen DNA-Kette,
- 2) die Vollendung einer neuen Kette von DNA verläuft nur zwischen ihnen,
- 3) Sie bestimmen den Ort der DNA-Polymerase Befestigung an der Matrix [53].
- 4) Durch die einzigartige Erkennungssequenz der Primer wird die spezifische Amplifikation des beabsichtigten Ziels ermöglicht [51].

Für die Entwicklung zielspezifischer Primer wurde NCBI Primer-BLAST nach SOP # 68 verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Die Liste der benötigten Primer, deren Basenabfolge sowie die Größe des erwarteten Produkts sind in Tabelle 6 angegeben.

Jeder PCR-Zyklus besteht aus 3 Schritten. Im Stadium der Denaturierung bei +95°C schmilzt die DNA-Kette und divergiert in zwei Ketten, was die Bindung der Primer ermöglicht. Im nachfolgenden Schritt tritt in Anwesenheit der gewünschten DNA in der Probe das Primer-Annealing (einer für jede Kette) auf. Die Temperatur der Primer-Bindung beträgt in der Regel zwischen +54°C und +62°C, und ist Abhängig von ihrer Nukleotidzusammensetzung. Durch anschließende Erhöhung der Temperatur auf +72°C wird die Taq-DNA-Polymerase aktiviert und der Syntheseschritt beginnt [53].

Die erforderliche Anzahl von Zyklen und die optimalen Bedingungen für jedes Primerpaar wurden basierend auf Vorversuchen bestimmt (siehe Tabelle 16). Für jede PCR wurde ein separater Ansatz für die PCR erstellt (siehe Tabelle 11). Da das Gesamtvolumen von 20 µl pro Reaktionsgefäß unabhängig von der Menge an verwendeter cDNA unverändert blieb, wurde die Menge an zugesetztem DEPC H₂O geändert. Als Positivkontrolle, wurde eine bereits im Labor getesteten cDNA genutzt und als Negativkontrolle DEPC H₂O.

Tabelle 11: PCR-Ansatz

Materialien	Menge [μl]
MasterMix	10
Forward primer	1
Reverse primer	1
Probe (cDNA) 10 ng/ μ l	x
DEPC H ₂ O	8-x

μ l = Mikroliter, cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure, DEPC = Diethylpyrocarbonat, H₂O = Wasser, ng = Nanogramm.

3.2.2.5 Gelelektrophorese

Um die gebildeten PCR-Produkte sichtbar zu machen, wurde die Gelelektrophorese-Methode nach SOP # 69 verwendet. Die Elektrophorese von DNA in einem Agarosegel ist die effektivste Methode zur Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe, wobei das Agarosegel als ein sogenanntes "Molekularsieb" wirkt. Negativ geladene Nukleinsäuren wandern unter dem Einfluss von elektrischem Strom von der Kathode zur Anode. Nukleinsäuren bewegen sich im Gel mit Geschwindigkeiten, die umgekehrt proportional zum Dezimallogarithmus ihrer Molekulargewichte sind [53].

Um ein Agarosegel mit einer Konzentration von 1,8 % nach SOP # 63 herzustellen, war es notwendig, 1,8 g Agarose in 100 ml 1x TBE zu lösen, aufzukochen und dann 7 μ l Ethidiumbromid zuzugeben [152]. Die resultierende Mischung wurde in einen Gelschlitten gegossen, in den Steckkämme eingetaucht wurden, um nach dem Gelieren Geltaschen zu bilden. Nach der Gelabkühlung wurden die Steckkämme entfernt und das Gel in eine mit 1x TBE gefüllte Elektrophoresekammer übertragen. In die erste Geltasche wurden 1,5 μ l des pUC19-Markers gegeben [152]. In jeder nachfolgenden Kammer wurden 7 μ l des PCR-Produkts gegeben. Die Elektrophorese-Trennung wurde 45 min bei einer Spannung von 90 V durchgeführt. Die Banden wurden im UV-Licht (GelDoc / 245 nm) durch die Fluoreszenz von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Dokumentation wurde mit dem Gel-Dokumentationssystem von Intas nach SOP # 70 erstellt. Die quantitative Bestimmung wurde mit der Software ImageJ (NIH, USA) ausgeführt. Normalisierung der cDNA-Proben erfolgte auf die Expressionsspiegel des GAPDH-Gens („house-keeping“ Gen).

3.2.3 DCFH-DA Assay für die ROS-Messung

Die intrazelluläre Produktion von ROS kann durch die Fluoreszenz von Dichlorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) gemessen werden. DCFH-DA passiert die Zellen und ist ein unpolares, gering fluoreszierendes Molekül. Die Zwei-Elektronen-

Oxidation von DCFH-DA führt zur Bildung eines fluoreszierenden Produkts [64], 2'7'-Dichlorofluorescein (DCFH), das sofort mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerät nachgewiesen wird. Für diese Untersuchung wurden die Zellen mit 10 µM DCFH-DA Lösung für 30 Minuten bei +37°C nach SOP # 112 inkubiert [155]. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden vor der Stimulation mit 200 µM NADPH Lösung (i DPBS) zweimal mit 100 µl PBS gewaschen. Als Positivkontrolle wurden 0,05 % H₂O₂ in DPBS verwendet. Nach 0, 5, 10 und 15 Minuten wurde die Fluoreszenz im Plate Reader mit dem Programm „DCFH-DA“ gemessen (Ex/Em: 485/520 nm).

3.2.4 Scratch-Assay

Der Scratch-Assay ist eine einfache, kostengünstige und gut entwickelte Methode zur Messung der Zellmigration *in vitro* [61]. Diese Methode ahmt die Zellmigration während der Wundheilung *in vivo* in einem vereinfachten Modell nach [62]. Die grundlegenden Schritte umfassen das Erzeugen eines "Kratzers" in einer Zellmonoschicht, sowie das Erfassen der Bilder zu Beginn und in regelmäßigen Abständen während der Zellmigration. Durch Vergleichen der Bilder wird die Migrationsrate der Zellen bestimmt [61, 62]. Der Assay eignet sich besonders für Studien über die Auswirkungen von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen auf die Zellmigration [62]. Ohne Berücksichtigung der Zeit für die Transfektion von Zellen dauert der Scratch-Assay normalerweise mehrere Stunden bis über Nacht [61].

Um die Migration von Zellen mittels der Scratch-Assays zu bewerten, wurden primäre humane Osteoblasten mit hoher Dichte in 48-Well-Platte ausplattiert und bis zur Erreichung der Konfluenz inkubiert. Dann wurde die Zellschicht mit einer Pipettenspitze (100 µl) zerkratzt und das Medium ersetzt um einzelne nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Unmittelbar danach wurden die Zellen stimuliert (\pm 5 ng / ml TGF- β / \pm Inhibitoren). Der Abstand zwischen den entstandenen Rändern wurde unmittelbar nach der Stimulierung (0 h) und 24 Stunden später mit einem Foto-Mikroskop dokumentiert. Eine quantitative Abschätzung [%] der Zellmigration wurde unter Verwendung der ImageJ-Software unter Verwendung der folgenden Formel durchgeführt: $100 - (\text{Bereich } 24 \text{ h} * 100 / \text{Bereich } 0 \text{ h})$.

3.2.5 Western Blot

Seit seiner Einführung im Jahr 1979 (Towbin *et al.*) ist das Blotting von Proteinen zu einem gewöhnlichen Werkzeug von Forschungslaboratorien geworden. Dies ist eine wichtige und routinemäßige Methode zur Proteinanalyse, die von der Spezifität der

Antikörper-Antigen-Wechselwirkung abhängt [58]. Bei dieser Technik wird eine Mischung von Proteinen basierend auf dem Molekulargewicht durch Gelelektrophorese getrennt. Diese Ergebnisse werden dann auf eine Membran übertragen, die für jedes Protein eine Bande erzeugt. Die Membran wird dann mit für das Protein spezifischen Antikörpern inkubiert. Die spezifisch gebundenen Antikörper werden dann mit Hilfe von markierten (Peroxidase oder Fluoreszenz) Sekundärantikörpern nachgewiesen. Dabei entspricht die Intensität der so enthaltenden Bande der Menge an vorhandenem Protein [55].

Das Western-Blot-Verfahren umfasst daher die folgenden Schritte:

1. Trennung einer Probe in einem Polyacrylamidgel nach Größe;
2. Übertragung der aufgetrennten Proteine auf die Membran;
3. Identifizierung eines spezifischen Proteins auf der Membran unter Verwendung eines geeigneten primären und sekundären Antikörpers.

3.2.5.1 Proteinlysate

Zelllysate sind die am meisten benutzte Form der Probe für einen Western Blot [55]. Nach SOP # 55 wurde für die Zellyse ein eiskalter RIPA-Lysepuffer verwendet, der Protease- und Phosphatase-Inhibitoren enthielt, um einen Proteinabbau zu vermeiden (siehe Tabelle 8). Zellkulturüberstand ist von den Zellen abgesaugt worden und 500 µl einer Arbeitslösung von RIPA wurden zu einer T75 cm² - Flasche zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Plastikspatel vom Boden der Platte gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde gesammelt und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde dann 10 Minuten bei +4°C und 13.000 g zentrifugiert um Zelltrümmer zu sammeln. Der Überstand, mit den gelösten Proteinen wurde wieder in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen. Proben wurden bei -80°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

3.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen der Proben, die auf ein Gel geladen werden sollen, müssen bestimmt werden [57]. Dies ermöglicht dem Forscher sicherzustellen, dass für den Vergleich der Proben die gleiche Menge Protein geladen wurde [55]. Dafür wurde die Micro-Lowry-Methode nach SOP # 56 verwendet [54]. Bei dieser Methode manifestiert sich die Proteinkonzentration durch eine Farbänderung, die mit einem Spektrophotometer gemessen werden kann.

Dazu wurden 2 µl jedes BSA Standards (doppelt oder dreifach) in eine 96-Well-Platte pipettiert. Dann wurden 2 µl jeder Probe (Duplikate oder Triplikate) auf Dieselbe

Platte pipettiert. Zu jeder zu bestimmenden Probe/Standards wurden 150 µl Lösung A (siehe Tabelle 8) zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert [149]. Danach wurden zu jeder Probe/Standard 30 µl der Lösung B (siehe Tabelle 8) gegeben und sofort gemischt, um eine Ausfällung zu verhindern [149]. Für die Farbentwicklung wurden die Proben für 1-6 Stunden bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln inkubiert. Die Adsorption wurde bei 750 nm vermessen (Lowry-Programm).

Die erhaltenen optischen Dichten wurden gegen die entsprechenden Proteinkonzentrationen aufgetragen, um eine Standardkurve zu erhalten. Eine lineare Trendlinie mit der Formel ($y = m * x + b$ mit m als Steigung und b als y-Achse) wurde erstellt und der Regressionskoeffizient (R^2) wurden in der Grafik angezeigt. Die Lösungsformel für x ist $x = (y - b) / m$. Die gemessenen optischen Dichten der Proben für x wurden eingefügt, um ihren Proteingehalt in µg/µl zu bestimmen.

Tabelle 12: Lowry Auswertung

Probe	PK	30 µg	H ₂ O [V=20 µl]	Puffer
266 Diff	5,33783784	5,6	14,4	5 µl
266 Diff +TGF-β	5,63313313	5,3	14,7	5 µl
266 Diff+ SB431542	6,22872873	4,8	15,2	5 µl
306 Diff	4,10660661	7,3	12,7	5 µl
306 Diff +TGF-β	4,39689690	6,8	13,2	5 µl
306 Diff+ SB431542	5,27777778	5,7	14,3	5 µl
319 Diff	5,45795796	5,5	14,5	5 µl
319 Diff +TGF-β	5,98848849	5,0	15,0	5 µl
319 Diff+ SB431542	5,02752753	6,0	14,0	5 µl
325 Diff	5,74824825	5,2	14,8	5 µl
325 Diff +TGF-β	5,77827828	5,2	14,8	5 µl
325 Diff+ SB431542	5,42792793	5,5	14,5	5 µl

µl = Mikroliter, H₂O = Wasser, V= Gesamtvolumen, µg = Mikrogramm.

3.2.5.3 Vorbereitung von Proteinproben

Das Gesamtvolumen der Probe, das pro Well geladen wurde, wurde entsprechend der Anzahl der Vertiefungen im Gel nach SOP # 57B berechnet (z. B. für Gele mit 10 Vertiefungen sollte es 27 µl nicht überschreiten). 4/5 des Endvolumens der zu ladenden Probebestand besteht aus 20-50 µg Protein + ddH₂O zur Volumen Anpassung und 1/5 Lämmli Ladepuffers. Die verbleibenden leeren Wells wurden mit ddH₂O + Lämmli Ladepuffer gefüllt, um Verzerrungen der Banden auf dem Gel zu verhindern. Die Proben wurden gut durchgemischt und kurz zentrifugiert, um Luftblasen zu vermeiden. Zur Proteindenaturierung wurden die Proben in einem

Heizblock 10 min lang bei +100°C gekocht. Die Proben wurden kurz zentrifugiert, um die kondensierten Partikeln zu sammeln. Die Proben sind sofort auf das Gel geladen worden. Ebenfalls wurden 4,5 ml Proteinmarker auf das Gel pipettiert, wonach sofort die Elektrophorese gestartet wurde.

3.2.5.4 Gelelektrophorese

Das Verfahren der SDS-PAGE basiert auf den Eigenschaften von SDS, welches ein stark anionisches Detergenz ist. Da Proteine nicht alle die gleiche elektrische Ladung aufweisen, werden die Proben mit SDS nach SOP # 57C behandelt wodurch die Proteine denaturiert und negativ geladen werden. Dies ermöglicht eine Trennung von Proteinen nach Molekulargewicht [57].

Der Western Blot verwendet zwei verschiedene Arten von Gelen: Stapel- und Trenngel. Das obere Stapelgel ist leicht sauer (pH 6,8) und hat eine niedrigere Acrylamidkonzentration, wodurch ein poröses Gel entsteht, das Proteine schlecht trennt, aber erlaubt, dünne, scharf begrenzte Banden zu bilden. Das untere Trenn- oder Auflösungsgel ist basisch (pH 8,8) und weist einen höheren Polyacrylamidgehalt auf, wodurch die Poren des Gels kleiner werden. Die Proteine, wenn sie auf das Gel geladen werden, haben eine negative Ladung. Da sie durch Erhitzen denaturiert wurden wandern sie zu der positiven Elektrode, wenn eine Spannung angelegt wird [55]. Die Aufnahme von Molekulargewichtsmarkern in das Gel hilft, die Größe der untersuchten Proteine nach ihrer Trennung in der Elektrophorese zu bestimmen [55].

3.2.5.4.1 Gel-Zubereitung

Nach SOP # 57A wurden die Glasplatten vor der Verwendung gründlich gereinigt und die Gelgießvorrichtung wurde montiert. Die Glasplatten wurden in der inneren Laufkammer platziert, die wiederum in die Gelgießvorrichtung geführt wurde, um die Glasplatten von unten abzudichten. Das Trenngel wurde gemischt (siehe Tabelle 13) und sofort in die vorbereitete Kammer gegossen. Bis das Gel polymerisierte, wurde es mit Isopropanol abgedeckt um eine gerade Gelfront zu erzielen. Nach der Beendung der Polymerisation wurde das Isopropanol vorsichtig entfernt. Danach wurde das Stapelgel gemischt (siehe Tabelle 14) und sofort über das Trenngel gegossen. Der Kamm wurde in das Gel gelegt. Nach etwa 30 Minuten hat sich das Stapelgel verfestigt und der Kamm konnte vorsichtig entfernt werden. Die Vertiefungen wurden sofort mit Lämmli Laufpuffer (1x) abgespült.

Tabelle 13: Trenngel-Zubereitung (1 Gel für eine Dicke von 1,5 mm)

Endkonzentration von (Bis-) Acrylamid	6 %	8 %	10 %	12 %	14 %
ddH ₂ O [ml]	6,8	5,8	5,0	4,3	3,3
1,5 M TRIS (pH= 8,8) [ml]	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
Acrylamid/ Bisacrylamid- Lösung 30 % [ml]	2,5	3,5	4,3	5,0	6,0
10 % SDS- Lösung [ml]	127,5	127,5	127,5	127,5	127,5
TEMED [ml]	12,8	12,8	12,8	12,8	12,8
10 % APS- Lösung [ml]	127,5	127,5	127,5	127,5	127,5

Tabelle 14: Stapelgel-Zubereitung

Endkonzentration von (Bis-) Acrylamid	3 %
ddH ₂ O [ml]	2,1
1 M TRIS (pH= 8,8) [ml]	0,38
Acrylamid/ Bisacrylamid- Lösung 30% [ml]	0,5
10 % SDS- Lösung [ml]	30,0
TEMED [ml]	3,0
10 % APS- Lösung [ml]	30,0

3.2.5.4.2 Western Blot SDS-Page

Die vorbereiteten Gele (2 Gele oder 1 Gel und 1 Dummy) wurden in die innere Arbeitskammer mit Proben tasche nach innen platziert. Die Gele wurden in der inneren Arbeitskammer fixiert und in ein Reservoir gegeben. Die innere Arbeitskammer wurde vollständig mit einem Elektrophorese Puffer (1x) gefüllt. Das Reservoir wurde mit ebenfalls mit Elektrophorese Puffer (1x) gefüllt, bis die Elektroden und der untere Teil der Gele mit Puffer bedeckt waren. Das Gel wurde mit den Proben gefüllt. Eine Tasche schloss 4,5 µl eines Molekulargewichtsmarkers ein, um später das Molekulargewicht der Zielproteine zu bestimmen [57]. Unmittelbar nach dem Beladen der Gele erfolgte die Elektrophorese. Die Laufkammer muss geschlossen und die Elektroden mit der Stromquelle verbunden sein. Es ist wichtig zu vergewissern, dass die Elektroden an das Gerät richtig angeschlossen sind (+/-). Wird eine Spannung an das Gel angelegt, wandern Proteine mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und diese unterschiedlichen Raten führen zu einer Trennung in Banden innerhalb jeder Spur [57].

Gele wurden bei 100-150 V betrieben. Höhere Spannungen können den Puffer überhitzen und die Bänder verzerren [55]. In Abhängigkeit von der Bisacrylamidkonzentration im Gel betrug die Laufzeit zwischen 30 und 90 Minuten.

Der Lauf wurde dann gestoppt, wenn die Lauffront (Bromphenol blau) das Gel verlassen hatte. Nach der Elektrophorese wurde die Laufkammer demontiert, nachdem zuvor die Stromversorgung unterbrochen und die Elektroden getrennt worden waren. Der Elektrophorese Puffer (1x) wurde aus der inneren Arbeitskammer und dem Reservoir entfernt. Die innere Arbeitskammer und die Gele wurden entfernt.

3.2.5.5 Übertragung von Proteinen

Der Prozess der Übertragung von Proteinen aus dem Gel auf die Membran ist als Blotting bekannt. Die Übertragung erfolgt unter Verwendung eines elektrischen Feldes, das senkrecht zur Oberfläche des Gels ausgerichtet ist, wodurch Proteine aus dem Gel auf die Membran gelangen [153]. Diese Art der Übertragung wird als elektrophoretische Übertragung bezeichnet und kann in halbtrockenen oder nassen Bedingungen durchgeführt werden (SOPs # 57D und 57E). Die Membran, der feste Träger, ist ein wesentlicher Teil dieses Prozesses [55]. Nitrozellulose ist die am meisten benutzte Membran [57].

Die erforderliche Menge an Filterpapier (Whatman-Papier) und die Nitrozellulosemembran wurden auf die Größe des Gels ausgeschnitten. Alle Arbeitsschritte wurden ausschließlich mit Handschuhen durchgeführt. Ein kleiner Behälter mit dem kalten Transferpuffer (1x), in den eine Nitrozellulosemembran für 5 Minuten eingetaucht wurde, wurde vorbereitet. Die Faserkissen (Schwamm) und das Filterpapier wurden mit Transferpuffer befeuchtet. Die Montage des Transfersandwiches wurde mit der Installation des schwarzen Kassettenlagers der Kompressionskassette begonnen. Das Sandwich enthält an jedem Ende ein Faserkissen und zwei Filterpapiere zum Schutz des Gels und der Blotting-Membran. Die Membran wurde in dem Sandwich zwischen der Geloberfläche und der positiven Elektrode angeordnet. Die Membran muss so platziert werden, dass die negativ geladenen Proteine vom Gel zur Membran wandern können [55]. Der enge Kontakt von Gel und Membran ist sehr wichtig, um ein klares Bild zu gewährleisten. Daher ist es vor der Endmontage des Transfersandwiches notwendig, Luftblasen zwischen dem Sandwich durch Druck zu entfernen. Zuletzt wurde die rote Kassettenklammer der Kompressionskassette platziert. Der Tank wurde geschlossen und die Elektroden wurden an die Stromversorgung angeschlossen. Es ist wichtig zu beachten, dass die Elektroden an das Gerät richtig angeschlossen sind (+/-). Die Übertragung wurde bei 100 mA für 2-3 Stunden oder 25 mA über Nacht durchgeführt. Nachdem die Übertragung abgeschlossen war, wurden die Stromversorgung und die Elektroden

zuerst getrennt. Dann wurde die Transferkammer demontiert. Der Transferpuffer (1x) wurde aus dem Reservoir entfernt. Die Wirksamkeit des Proteintransfers hängt von der Art des verwendeten Gels, der Molekülmasse des Proteins und der Art der Membran ab [57].

Für den reversiblen Nachweis des Proteintransfers auf die Membran wurde eine Ponceau S-Lösung nach SOP # 57F verwendet. Dafür wurde die Membran in einen kleinen Behälter gegeben und vollständig mit der Lösung bedeckt. Die Membran wurde 1-5 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde die Ponceau S-Lösung in den Lagertank zurückgegossen (da die Lösung wiederverwendet werden kann). Die Membran wurde kurz mit Leitungswasser gespült, um überschüssigen Farbstoff zu beseitigen. Markerbanden und die Blot-Nummer wurden auf der Membran mit einem Bleistift markiert. Die Membran wurde gegebenenfalls mit einem Skalpell auf die richtige Größe geschnitten. Nach Auswaschen des restlichen Ponceau S Farbstoffes wurden die Membranen geblockt.

3.2.5.6 Blockierung und Antikörperinkubation

Die Art des Blockierungspuffers hängt von den verwendeten Proben, Membranen und Antikörper ab und muss für jedes Experiment individuell optimiert werden. Eine ausreichende Menge an Blockierungspuffer wurde nach SOP # 57G hergestellt (siehe Tabelle 5). Die Membran wurde in den Blockierungspuffer eingetaucht und für mindestens 1 Stunde bei RT und Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran kurz mit TBS-T gewaschen, um den restlichen Blockierungspuffer zu entfernen [149]. Nach dem Blockieren wird der Blot mit einem oder mehreren Antikörpern inkubiert. Es ist wichtig, ein gutes Blockierungsmittel und ein geeignetes Paar von primären und Peroxidase-markierten sekundären Antikörpern auszuwählen, um gute Ergebnisse in der Western-Blot-Analyse zu erhalten [56]. Die Antikörper werden üblicherweise in Waschpuffer (TBS-T) verdünnt [55]. Das Verdünnungsverhältnis von Antikörper beginnt üblicherweise bei einer Verdünnung von 1:1000 in TBST. Wenn das Signal zu stark ist, muss der Verdünnungsfaktor erhöht werden. Für den Fall, dass sich das Signal nicht entwickelt oder sehr schwach ist, sollte die Menge an beladenem Protein erhöht werden oder der Verdünnungsfaktor verringert werden. Wenn zu viele unspezifische Bänder erscheinen, kann Blockierungslösung hinzugefügt werden. Der primäre Antikörper bindet an das Zielprotein und der sekundäre Antikörper mit einem Enzym, wie Meerrettichperoxidase (HRP), bindet an den primären Antikörper. Das Reaktionsprodukt der HRP erzeugt Lumineszenz, die

von der Menge an Protein abhängig ist [57]. Chemilumineszenzsignale können mit einer CCD Kamera (z.B. ChemiDoc (INTAS, Göttingen, Deutschland)) nachgewiesen werden.

Der primäre Antikörper wurde zur ‚blockierten‘ Membran gegeben und entweder 2-4 Stunden bei RT oder über Nacht bei +4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die primäre Antikörperlösung wurde entfernt und zur Wiederverwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Membran wurde dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Das Waschen ist sehr wichtig, da es den Hintergrund minimiert und ungebundenen Antikörper entfernt [55]. Die Membranen wurden dann mit dem entsprechenden markierten sekundären HRP-Antikörper (1:5000 in TBS-T) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Genauso wie die Lösung der Primärantikörper kann die Sekundärantikörperlösung wiederverwendet werden, wenn sie bei +4°C gelagert wird (ca. 1 Woche). Dann wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T für 10 Minuten gewaschen. Während der letzten Waschschriffe wurde ECL-Substrat zur Entwicklung von Western-Blot-Signalen vorbereitet. Die ECL-Mischung wurde auf Basis der der Lösungen A und B nach SOP # 57H hergestellt (siehe Tabelle 5). Beide Lösungen wurden unmittelbar vor der Verwendung vermischt. Die Membran wurde mit der resultierenden ECL-Lösung beschichtet und für 1 Min. bei RT inkubiert. Relative Niveaus der Proteinexpression können dann durch Vergleichen der Intensitäten der Banden zur den Intensitäten der Referenzbanden (z.B. β -Actin oder Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase [GAPDH]) ermittelt werden [57].

3.2.5.7 Strippen von Western-Blot-Membranen

Nach SOP # 57I wurde zuerst die Membrane für 5 Minuten in TBS-T gewaschen (Schütteln). Dann wurde die Membran 5 Minuten in salzfreiem Wasser gewaschen (Schütteln). Danach wurde die Membran für 5 Minuten in 200 mM NaOH wieder unter Schütteln gespült. Die Membran wurde erneut 5 Minuten in salzfreiem Wasser gewaschen (Schütteln). Schließlich wurde die Membran für 5 Minuten in TBS-T gespült. Danach kann der Nachweis eines neuen Zielproteins fortgesetzt werden, indem die Membran blockiert und die Antikörper inkubiert werden.

3.2.6 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist ein sehr sensitiver serologischer Test, der sowohl die Fähigkeit von Antikörpern, an Ziele zu binden, als auch das Fluoreszenzmikroskop nutzt, um die Strukturen zu visualisieren, an die sie binden [60]. Die Methode beruht auf der richtigen Fixierung der Zellen, um die zelluläre

Materialien und Methoden

Verteilung des Antigens zu erhalten und die Zellmorphologie zu bewahren. Nach der Fixierung werden die Zellen dem primären Antikörper (gerichtet gegen das Zielprotein) in Gegenwart permeabilisierender Reagenzien ausgesetzt, um den Zugang des Antikörpers zum Epitop sicherzustellen. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wird der ungebundene Antikörper entfernt und der gebundene primäre Antikörper wird dann durch Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper, der gegen die Wirtsspezies des primären Antikörpers gerichtet ist, markiert [59].

Zur Durchführung dieser Art der Färbung wurden die Zellen nach SOP # 105A unter sterilen Bedingungen in eine 24-Well-Platte überführt, auf deren Boden zuvor sterile mit Kollagen beschichtete Deckgläser angeordnet wurden. Direkt darin wurden die Zellen gezüchtet, bearbeitet, fixiert und gefärbt. Die Zellen wurden einen Tag vor dem Anfärben aufgetragen, um eine Konfluenz von 60-80 % zu erreichen. Am nächsten Tag wurde das Medium aspiriert [155]. Mit einer Pipettenspitze wurde die Zellschicht mechanisch verletzt und die Zellen wurden mit rekombinantem humanem TGF- β (5 ng/ml) für 4 Stunden stimuliert. Nach der Behandlung mit TGF- β wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen, und mit einer 4 %-igen Formaldehydlösung für 10 Minuten bei RT fixiert. Die Zellen wurden mit einer %-igen Triton-x-Lösung für 10 min bei RT permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut mit einer 2 %-igen Formaldehydlösung für 10 Minuten bei RT fixiert. Die Zellen wurden dreimal mit DPBS für 10 min bei RT gespült. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden Zellen mit Blockierungspuffer abgedeckt und für 1 Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen kurz mit DPBS gewaschen, um restlichen Blockierungspuffer zu entfernen. Primäre Antikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung in DPBS) wurden auf die Zellen aufgetragen. Inkubation von primären Antikörpern wurde über Nacht bei +4°C durchgeführt. Die Zellen wurden wieder dreimal mit DPBS für 10 min bei RT gewaschen. Den Fluorophor-konjugierten sekundären Antikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung) wurde in DPBS verdünnt und auf die Zellen aufgetragen. So wurden die Zellen vor Licht geschützt für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit DPBS für 10 min bei RT gewaschen. Um die gefärbten Zellen zu fixieren und einzudecken wurde Mounting Medium verwendet. 3-4 Tropfen des Eindeckmediums wurden direkt auf die Probe aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Das Deckglas wurde behutsam unter Vermeidung von

Luftblasen aufgetragen. Dann wurde die Probe zu verfestigen über Nacht bei +4°C stehen gelassen. Nach Entfernung des überschüssigen Mounting Mediums wurden die gefärbten Zellen mikroskopiert.

3.3 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte in Abstimmung mit PD Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert. Die Experimente wurden in ausreichenden biologischen Replikaten durchgeführt. Die Diagramme und Tabellen enthalten die arithmetischen Mittelwerte und ihre Standardfehler. Die Anzahl der Patienten (N) sowie die Anzahl der experimentellen Wiederholungen pro Patient (n) sind in den Grafiken wiedergegeben. Für die statistische Auswertung sowie für das Erstellen der Grafiken wurde Software GraphPad Prism 5 (El Camino Real, USA) benutzt [152]. Für die statistische Analyse von Daten von drei oder mehr Gruppen wurde One-Way ANOVA (Kruskal Wallis) verwendet, gefolgt von der Anwendung von Dunn's multiplen Vergleichstest [152]. Die statistische Signifikanz wurde als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ definiert.

4. Ergebnisse

4.1 Genexpressionsanalyse

Um die Auswirkung von TGF- β auf die Expression von mit oxidativem Stress assoziierten Genen in primären humanen Osteoblasten zu ermitteln, wurde die RT² Profiler PCR Array Oxidative Stress Plus gewählt [149]. Für diese Untersuchung wurden menschliche primäre humane Osteoblasten in Kulturschalen ausplattiert und in Gegenwart oder Abwesenheit von 5 ng / ml rekombinatem humanem TGF- β 1 (rhTGF- β 1) in Osteoblastendifferenzierungsmedium kultiviert. Nach 48 Stunden wurde mRNA aus den Zellen isoliert und cDNA wurde durch reverse Transkriptase synthetisiert [152]. Unter Verwendung des RT² Profiler PCR Array Oxidative Stress Plus wurde die Expression von Genen in gepoolten (N = 8, n = 2) Proben evaluiert [152].

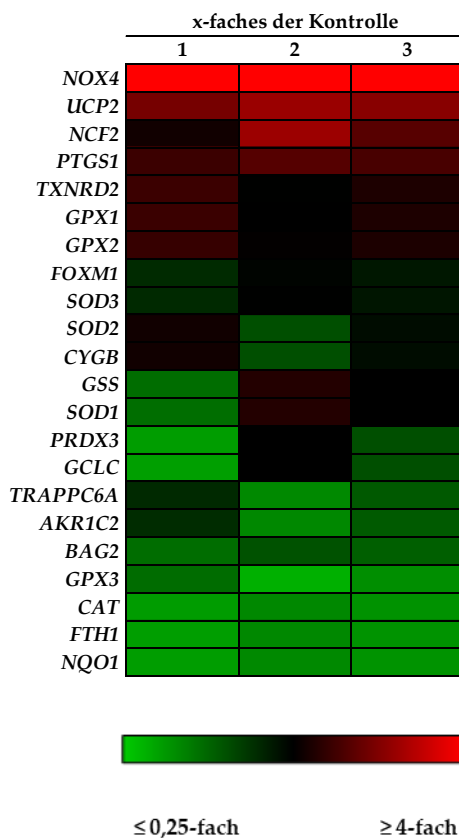


Abbildung 4: Expression von mit oxidativem Stress assoziierten Genen unter dem Einfluss von TGF- β 1

Der Unterschied im Ausmaß der Genexpression in behandelten und unbehandelten mit rhTGF- β 1 Zellen (N = 8/ kombiniert; n = 2) wurde unter Verwendung der RT² Profiler PCR Array Oxidative Stress Plus (Qiagen, Hilden, Deutschland) bestimmt und mittels einer Wärmekarte demonstriert.

Ergebnisse

Die Expression von *CAT*, *FTH1* und *NQO1* betrug ca. halb so viel in TGF- β 1 behandelten phOBs verglichen mit unbehandelten phOBs. Die Genexpression von *UCP2* zeigte sich generell wenig verändert. Bei Osteoblasten, die mit TGF- β 1 behandelt wurden, betrug die Expression von *GPX3* nur ein Drittel im Vergleich zu unbehandeltem phOBs. Die stärkste Veränderung der Genexpression wurde jedoch für *NOX4* nachgewiesen.

4.2 Induktion von NOX4-Expression durch TGF- β 1

Die Veränderungen der Genexpression wurden für die einzelnen Proben durch semiquantitative RT-PCR unter Verwendung des KAPA2G Fast Ready Mix von Peqlab bestätigt [63]. Die für die Amplifikation der gewünschten DNA-Abschnitte wurden genspezifischen Primer (siehe Tabelle 15) unter Verwendung der Primer NCBI - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) erzeugt.

Tabelle 15: Oligonukleotide

Exon	Primer forward/reverse	Sequence	Länge [bp]
<i>GAPDH</i>	5' Primer (forward)	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	420
	3' Primer (reverse)	AGGGGTCTACATGGCAACTG	
<i>CYGB</i>	5' Primer (forward)	GCCATCCTGGTGAGGTTCTT	459
	3' Primer (reverse)	GTGGAGTTAGGGGTCCTACG	
<i>CAT</i>	5' Primer (forward)	ACCTCGTGGGTTTGCAGTGA	763
	3' Primer (reverse)	CGAGCACGGTAGGGACAGTTCA	
<i>FOXM1</i>	5' Primer (forward)	GAAGAACTCCATCCGCCACA	182
	3' Primer (reverse)	GCTGTGATTCCAAGTGCTCG	
<i>GPX3</i>	5' Primer (forward)	CTGACGGGCCAGTACATTGA	156
	3' Primer (reverse)	TCCACCTGGTTCGGACATACT	
<i>NOX4</i>	5' Primer (forward)	CGGGCTTCCACTCAGTCTTT	297
	3' Primer (reverse)	TCCTAGCCCCAACATCTGGT	
<i>SOD2</i>	5' Primer (forward)	GCAGCTGCACCACAGCAAGC	422
	3' Primer (reverse)	CGTGCTCCACACATCAATCCC C	
<i>UCP2</i>	5' Primer (forward)	CCCCTGTAGACGTGGTCAAG	131
	3' Primer (reverse)	GGAGGGCATGAACCCTTTGT	

bp = Basenpaare, *GAPDH* = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, *CAT* = Catalase, *CYGB* = Cytoglobin, *FOXM1* = forkhead box Protein M1, *GPX3* = humane Glutathione peroxidase 3, *NOX4* = Nicotinamadeninucleotidphosphat-Oxidase 4, *SOD2* = Superoxide dismutase 2, *UCP2* = mitochondrial uncoupling protein 2

Die optimalen Parameter, wie die Mengen an cDNA, die Temperatur und die Anzahl der Zyklen, wurden durch Vorversuche für jeden Primer bestimmt (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: PCR-Bedingungen der Exons

Ergebnisse

Exon	Temp [°C]	Zyklen	Template [ng]	Zeit [s]	Positivkontrolle
<i>GAPDH</i>	56	35	20 ng	15/15/10	Osü MIX
<i>CAT</i>	58	35	50 ng	15/15/10	Osü MIX
<i>CYGB</i>	56	40	80 ng	15/15/10	Osü MIX
<i>FOXM1</i>	62	35	80 ng	15/15/10	NR I/G
<i>GPX3</i>	58	35	30 ng	15/15/10	Osü MIX
<i>NOX4</i>	62	35	40 ng	15/15/10	Osü MIX
<i>SOD2</i>	62	30	30 ng	15/15/10	Osü MIX
<i>UCP2</i>	60	35	30 ng	15/15/10	Osü MIX

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, *CAT* = Catalase, *CYGB* = Cytoglobin, *FOXM1* = forkhead box Protein M1, *GPX3* = humane Glutathione peroxidase 3, *NOX4* = Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-Oxidase 4, *SOD2* = Superoxide dismutase 2, *UCP2* = mitochondrial uncoupling protein 2, ng = Nanogramm, OSÜ = Osteoblastenüberstand, PCR = polymerase chain reaction, Temp = Temperatur

PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese getrennt und durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht (Geldoc, INTAS, Göttingen, Deutschland). Einzelne Proben wurden zweimal durchgeführt ($n = 2$), um die durch kleine Ladungsdifferenzen verursachten Variationen zu reduzieren. Signalintensitäten wurden unter Verwendung der ImageJ-Software (NIH, Bethesda, USA) quantifiziert [63]. Als Referenz für den Vergleich der erhaltenen Ergebnisse wurden die Werte von *GAPDH* verwendet. Unter dem Einfluss von TGF- β 1 zeigte die Expression von *GPX3* in diesem Experiment im Vergleich zu unbehandelten PhOB unbedeutende positive Veränderungen. Verminderte Expression von *CAT* bestätigte die zuvor angegebenen Veränderungen, die mit dem Human Oxidative Stress Plus RT² Profiler PCR Array festgestellt wurden. RT-PCR ergab auch keine signifikanten Veränderungen im Expressionsniveau sowohl von *FOXM1*, als auch von *SOD2*. Die *UCP2*-Expression zeigte gegenüber der vorherigen Methode einen Anstieg um ein Drittel. Der einzige signifikante Anstieg der Expression durch TGF- β 1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde bei *NOX4* beobachtet [152]. Die Analyse zeigt einen wesentlichen Zuwachs ($p < 0,01$) der *NOX4*-Genexpression nach 2 Tagen nach Stimulation mit rhTGF- β 1 [149].

4.2.1 Expression der NOX4

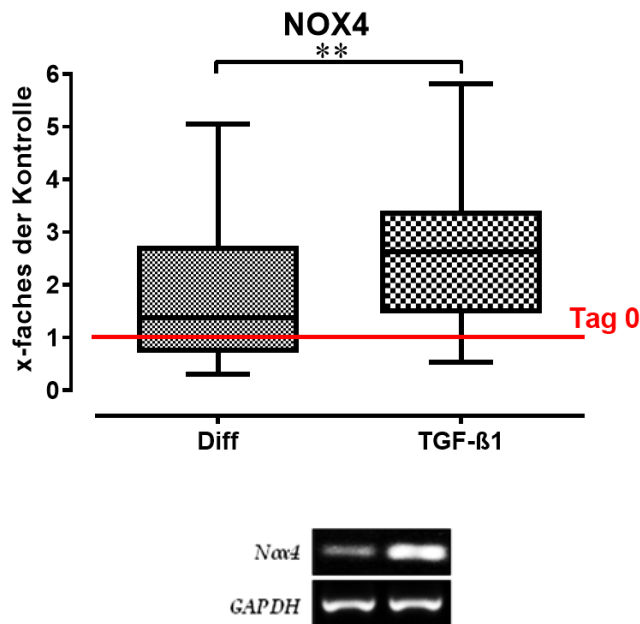
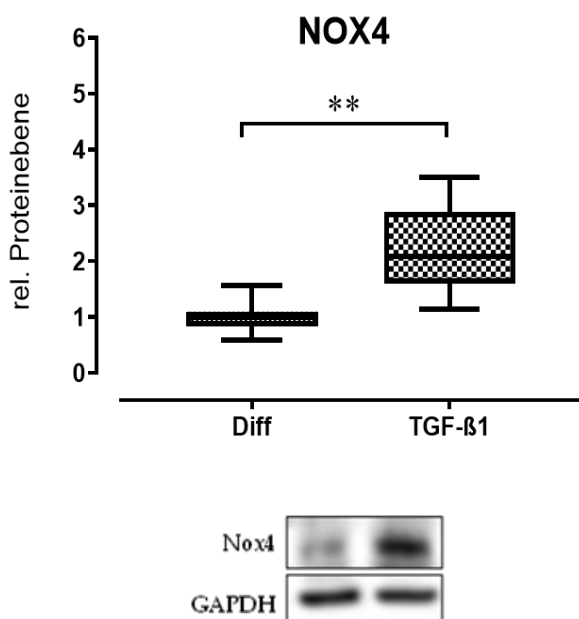


Abbildung 5: signifikante Genexpression von NOX4 unter TGF- β -Stimulation.

Patientenzahl (N) = 10, Anzahl Versuchsdurchführungen pro Patient (n) = 2. Rote Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100 %, ** = $p < 0,01$, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, NOX4 = NADPH-Oxidase 4, TGF- β 1 = Transforming Growth Factor beta1.

4.3 TGF- β 1 beeinflusst die Expression von NOX4 auf Proteinebene

Um erhöhte NOX4 Spiegel in rhTGF- β 1 behandelten Osteoblasten auf Proteinebene zu verifizieren wurde Western Blot durchgeführt. Mit TGF- β 1 behandelte primäre Humane Osteoblasten haben eine signifikante Erhöhung des NOX4-Spiegels im Vergleich zu unbehandelten Zellen gezeigt.



Ergebnisse

Abbildung 6: Western Blot mit NOX4.

Bestimmung des NOX4-Proteingehalts durch Western Blot. Die Bandenintensität wurde mit Hilfe der ImageJ-Software quantifiziert. N = 10, n = 2, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, NOX4 = NADPH-Oxidase 4, TGF- β = Transforming Growth Factor beta, ** = $p < 0,01$.

4.4 Zunahme der ROS-Produktion als Reaktion auf eine erhöhte NOX4-Aktivität

Um die Aktivität von NOX4 in primären humanen Osteoblasten und die anschließende intensive Bildung von ROS zu bestätigen, wurden die Zellen 48 Stunden in Gegenwart oder Abwesenheit von 5 und 10 ng/ml rhTGF- β 1 kultiviert, und der ROS-Gehalt wurde mittels DCFH-DA-Assay bestimmt [149]. Ein wesentlicher Zuwachs der intrazellulären ROS-Bildung (* $p < 0,05$) wurde durch die Hinzufügung von NADPH, einem Substrat für NOX4, erzeugt. Als positive Kontrolle wurde H₂O₂ verwendet. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass NOX4 zu einer NADPH-Oxidase-abhängigen ROS-Produktion beiträgt [36].

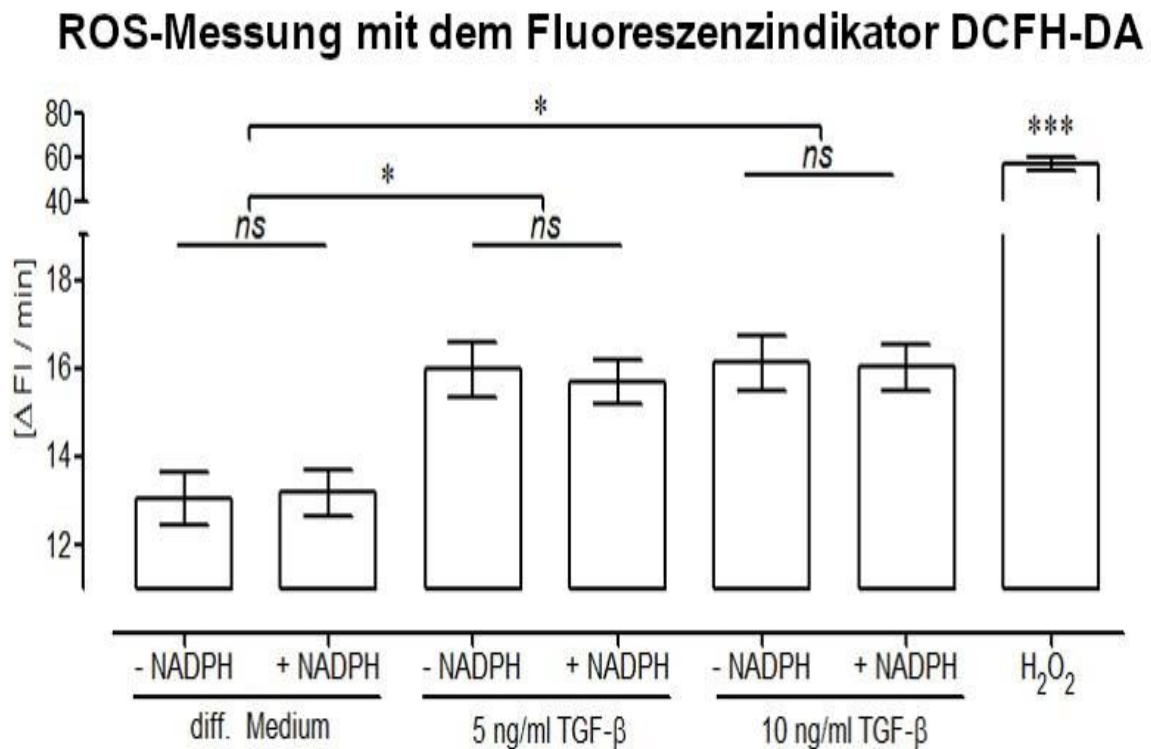


Abbildung 7: Bestimmung der ROS-Spiegel

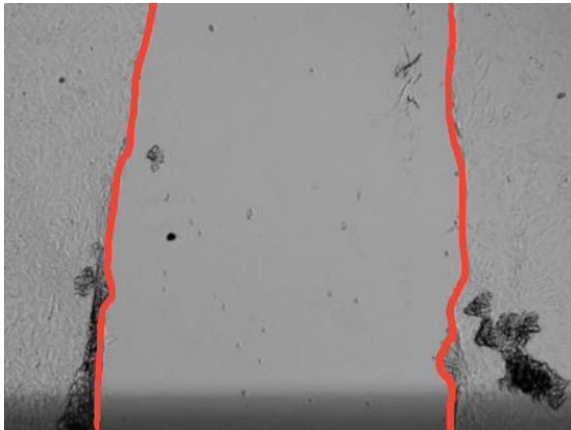
Nach 48-stündiger Stimulation mit 5 ng/ml rhTGF- β 1 bzw. 10 ng/ml rhTGF- β 1, N = 4, n = 10, ns = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$, TGF- β 1 = Transforming Growth Factor beta1. H₂O₂ = Wasserstoffperoxid (als positive Kontrolle), NADPH = Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (als Substrat für NOX4).

4.5 Beschleunigte Wundheilung durch TGF- β

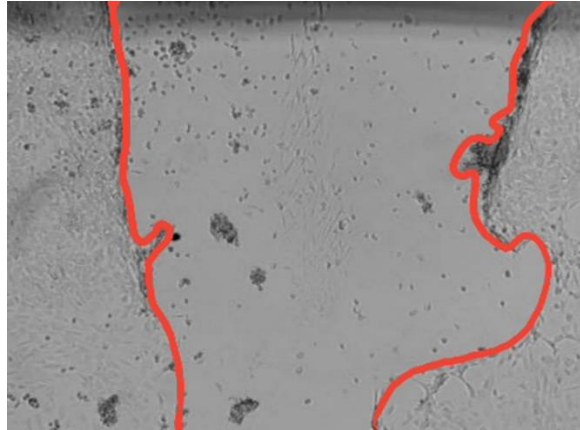
Um die Wirkung von TGF- β 1 auf die Vitalfunktionen von primären Osteoblasten zu untersuchen, wurde ein Scratch-Assay durchgeführt. Die Kontrollmikroskopiebilder wurden unmittelbar nach Behandlung der primären Osteoblasten und nach 24-stündiger osteogener Differenzierung in Gegenwart oder Abwesenheit von 5 ng/ml rhTGF- β 1 durchgeführt (Abbildung 7a – 7d). Der Verschluss von Lücken wurde durch Zugabe von rhTGF- β 1 (5 ng/ml) zum Kulturmedium stark beschleunigt (Abbildung 7d). Der Scratch-Assay hat gezeigt, dass sich die gesetzte „Wunde“ in Gegenwart von 5 ng/ml rhTGF- β 1 viele schneller schloss. Ob es durch Migration oder Proliferation verursacht wurde, wird durch Western-Blot weiteruntersucht.

Ergebnisse

(a)



(b)



(c)



(d)

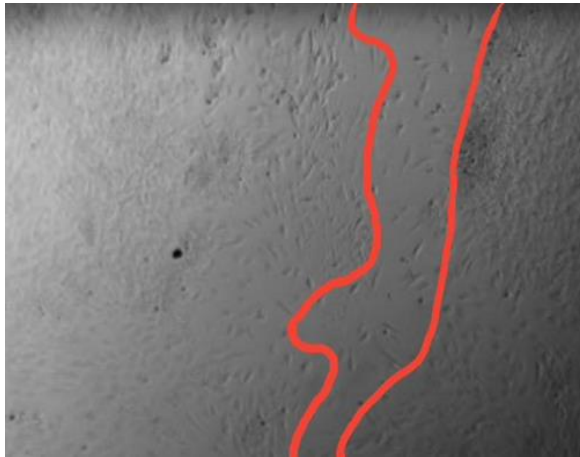


Abbildung 8: Scratch-Test.

a) Tag 0 ohne rhTGF- β 1, b) Tag 0 mit 5 ng/ml rhTGF- β 1, c) Tag 1 ohne rhTGF- β 1, d) Tag 1 mit 5 ng/ml rhTGF- β 1 - der Lückenschluss wurde in Gegenwart von 5 ng/ml TGF- β 1 beschleunigt.

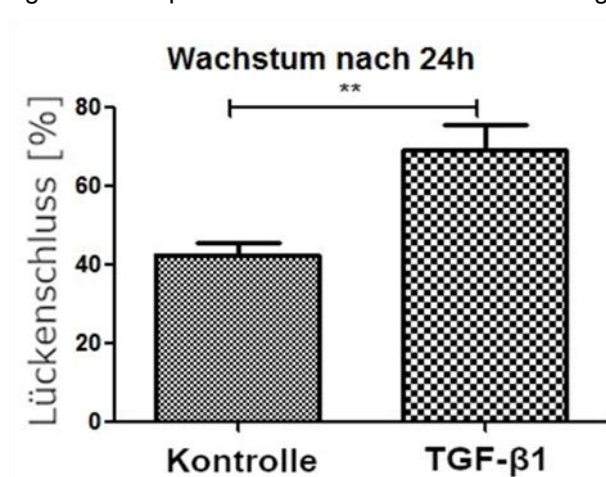


Abbildung 9: Einfluss von rh-TGF- β 1 auf die Migrationsrate von primären humanen Osteoblasten.

Ergebnisse

Bestimmung des Lückenschlusses nach 24-stündiger Stimulation mit 5 ng/ml TGF- β 1. N = 5, n = 2, TGF- β 1 = Transforming Growth Factor beta 1, ng = Nanogramm, ml = Milliliter.

Für den Scratch-Assay wurde mit Hilfe der ImageJ - Software die Schließung der „Wunde“ aus mikroskopischen Aufnahmen (100 - (Bereich 24 h * 100 / Bereich 0 h)) bestimmt. Die Daten sind als Balkendiagramm dargestellt (Mittelwert \pm 95 % C.I.), ** $p < 0,01$ wie angegeben.

Um die TGF- β 1-Signalgebung in Zellen zu blockieren, wurden Osteoblasten mit einem Alk5-Inhibitor (Alk5i / SB431542) co-inkubiert, was zu einer signifikanten Verlangsamung beim Schließen der Lücke führte. Eine effektive Blockierung des TGF- β -Signalings wurde bei einer Konzentration von 5 nM SB431542 erreicht [65].

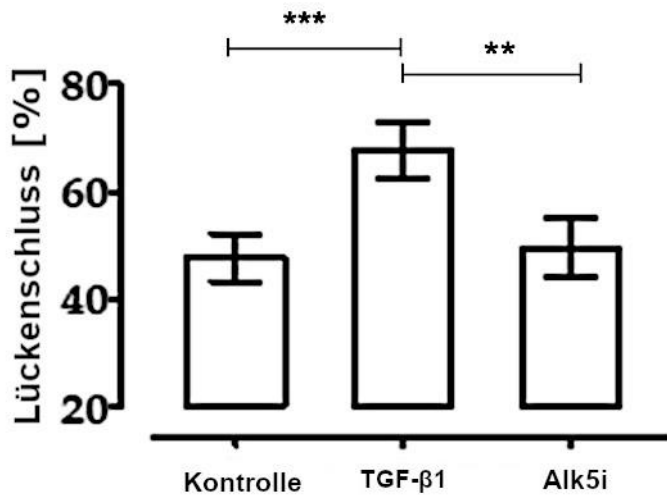


Abbildung 10: Wirkung des TGF- β -Inhibitors (Alk5i / SB431542) auf die Wundheilung.

Bestimmung des Lückenschlusses nach 24-stündiger Stimulation mit 5 ng/ml rhTGF- β 1 bzw. 5 nM Alk5-Inhibitor. N = 5, n = 2. TGF- β 1 = Transforming Growth Factor beta 1, ng = Nanogramm, ml = Milliliter, nM = Nanomolar. ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

4.6 Ergebnisse Western Blot mit FAK, Vimentin und PCNA

Basierend auf den bereits in der Literatur vorhandenen Daten wurde der Mechanismus der Auswirkung von NOX4 auf die Zellmigration auf die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase-Signalisierung getestet.

Western Blot-Verfahren zeigte eine basale Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase in Osteoblasten, welche nur geringfügig (nicht signifikant) in Gegenwart rhTGF- β 1 verstärkt wurde. Die Blockierung der NOX4-Aktivität in Zellen durch Co-Inkubation mit Apocynin (NOX4i) beeinflusste den FAK-Spiegel nicht signifikant.

Ergebnisse

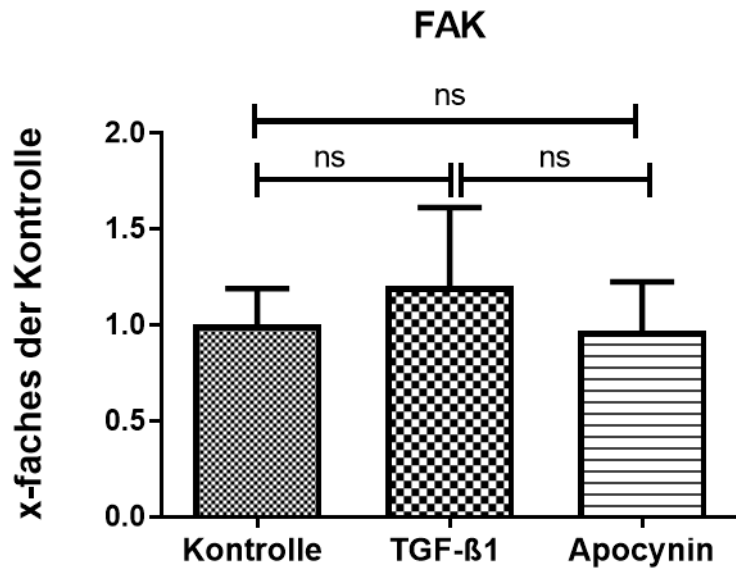


Abbildung 11: Western Blot Detektion von fokalen Adhäsionskinase (FAK).

Bestimmung des FAK-Spiegels. N = 4, n = 2, TGF-β1 = Transforming Growth Factor beta1, ns = nicht signifikant.

Als alternativer Wirkmechanismus von NOX4-Auswirkungen auf die Osteoblasten-Migration wurde WB mit Vimentin durchgeführt, einem Marker für migrierende Zellen. Es wurde ein geringfügiger (nicht signifikanter) Anstieg des Vimentin-Spiegels auf Proteinebene in rhTGF-β1 stimulierten primären humanen Osteoblasten beobachtet.

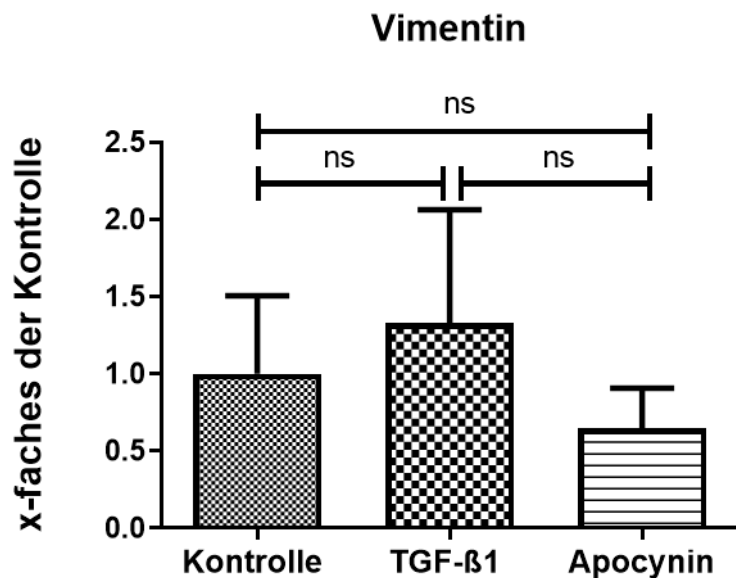


Abbildung 12: Western Blot Detektion von Vimentin.

Bestimmung des Vimentin-Spiegels. N = 4, n = 2, TGF-β1 = Transforming Growth Factor beta1, ns = nicht signifikant.

Ergebnisse

Die mit Apocinin, dem Inhibitor von NOX4 (NOX4i), behandelten Zellen zeigten verringerte Vimentin-Spiegel.

Für Ausschluss von Proliferation wurde die Expression von PCNA als Proliferationsmarker in Osteoblasten \pm 5 ng/ml rhTGF- β 1 (24/48 h) im WB überprüft. Die Ergebnisse des PCNA Western Blot sind in Abbildung 10 dargestellt. Bei der Untersuchung der PCNA-Spiegel in durch rhTGF- β 1 stimulierten primären humanen Osteoblasten wurde keine statistisch signifikante Änderung der Zellproliferation nachgewiesen. Daraus kann geschlossen werden, dass sich unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors rhTGF- β 1 keine Veränderung der Zellproliferation ergibt. Um NOX4-Aktivität zu blockieren, wurden die Zellen mit Apocinin (NOX4i) co-inkubiert. Die chemische Hemmung von NOX4 durch Apocinin hat im Vergleich zur Kontrolle praktisch keinen Einfluss auf die PCNA-Spiegel [152].

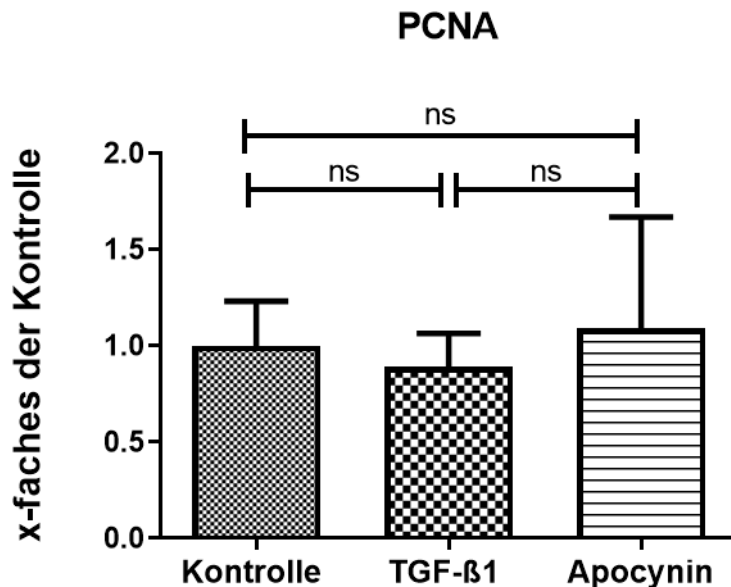


Abbildung 13: Western Blot Detektion von PCNA.

Bestimmung des PCNA – Spiegels. N = 4, n = 2 TGF- β 1 = Transforming Growth Factor beta 1, ns = nicht signifikant.

4.7 Immunfluoreszenzfärbung mit Vimentin zeigt eine Zunahme seiner Konzentration entlang der Migrationskante

Schließlich wurde eine Immunfluoreszenzmikroskopie mit Vimentin verwendet, um die mit Western Blot erzielten Ergebnisse zu bestätigen und sichtbar zu machen. Auf dem Bild ist sichtbar, dass die Zellen an der Migrationsfront stärker für Vimentin angefärbt wurden als die Zellen im Zellrasen.

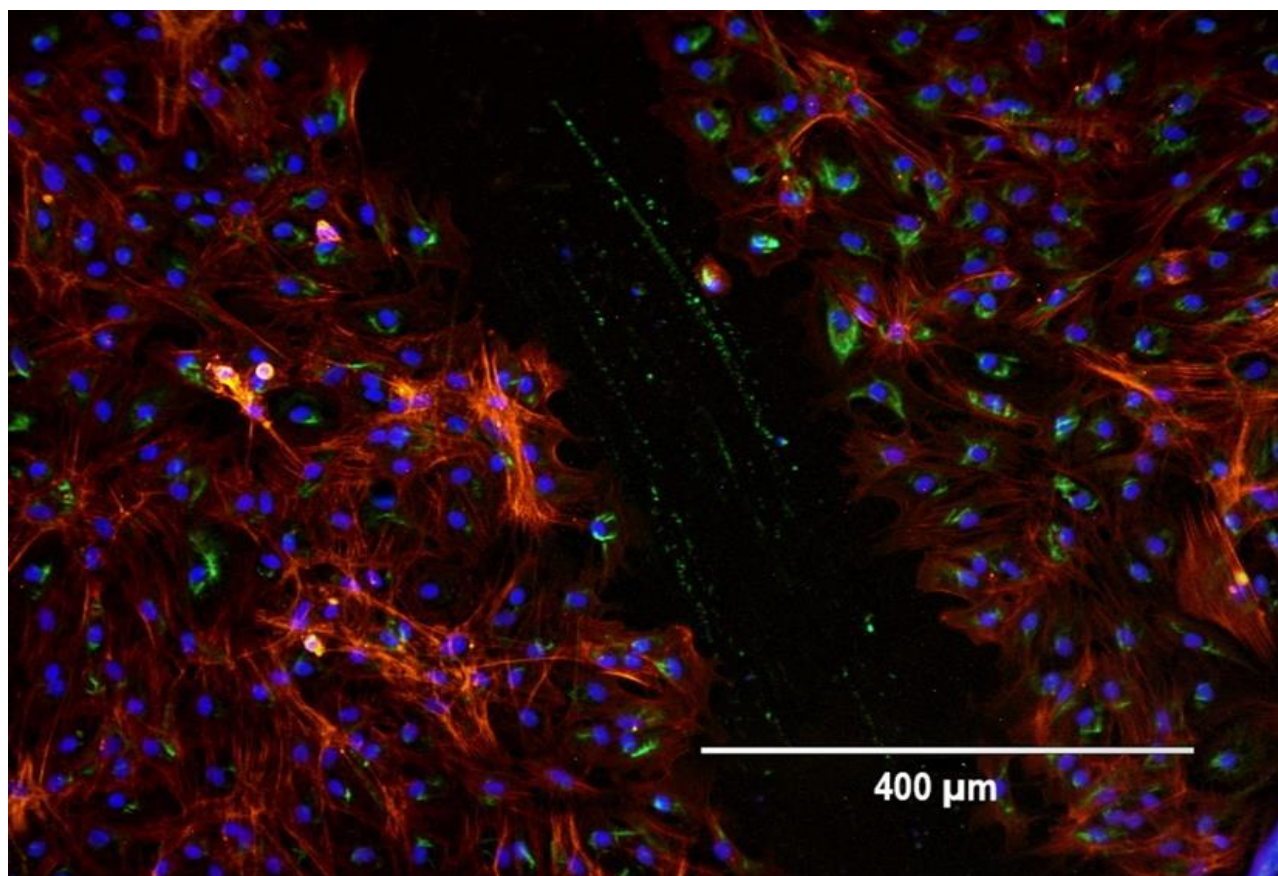


Abbildung 14: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung für Vimentin.

blau = Zellkerne, rot = Zytoskelett (Actin), grün = Vimentin

5. Diskussion

Die Frage der schnellen und maximalen «spurlosen» Frakturheilung ist nicht erst heute aufgetaucht, und seit langem suchen Ärzte und Wissenschaftler nach Antworten auf die Frage, welche Mechanismen dabei eine entscheidende Rolle spielen. Einer der vielen Anwörter auf diese Rolle sind im Blut zirkulierende Faktoren, welche die Frakturheilung anregen und kontrollieren sollen. Daher wird nun nach neuen pharmakologischen Wirkstoffen gesucht, deren Zugabe die Mikrozirkulation in der Fraktur, die vaskuläre Keimung und/oder Knochengeweberegeneration an der Stelle des Defekts verbessern [14].

Eine Reihe von Bedingungen, wie die Adsorption von Proteinen, die Adhäsion von Zellen, deren Proliferation, Differenzierung und Migration, sowie die Wiedergabe von lokalen Faktoren, die Osteoidbildung und die Verkalkung der Knochenmatrix sind für eine optimale Knochenbildung notwendig [113].

Wie einige andere Arbeiten bereits zeigten, wird durch eine akute Entzündungsreaktion im Bereich des Operationsfeldes eine große Anzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren freigesetzt und/oder aktiviert [11, 82].

Die folgenden Faktoren werden hervorgehoben, die eine Schlüsselrolle bei der Stimulierung der Knochenneubildung spielen: Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IGF-1, PDGF, EGF, FGF, BMP und TGF- β [113, 127, 128]. Viele dieser Proteine werden normalerweise im Skelettgewebe exprimiert, während andere an der Stelle der Verletzung aus assoziierten Entzündungszellen freigesetzt werden [127]. Zu den Faktoren, die als erste eine Kaskade von Knochenregenerationsprozessen auslösen, gehören PDGF und TGF- β . Beide Faktoren werden im Wundbereich von degranulierenden Thrombozyten, extrazellulärer Knochenmatrix und Entzündungszellen freigesetzt. [127, 128]. Es wird vermutet, dass diese lokal freigesetzten Faktoren die initiale Heilung fördern [113]. Als Ergebnis wandern osteogene Vorläuferzellen in das Frakturhämatom und synthetisieren das Kollagenetzwerk, das zu einer ‚Arena‘ für die Wundheilung wird. Dabei bestimmt die lokale Produktion von Zytokinen die spätere Knochenqualität oder die Narbenbildung [14].

Centrella *et al.* beschreiben, dass TGF- β ein starker Regulator der Knochenbildung ist, der die Replikation von Osteoblasten und ihre biochemische Aktivität beeinflusst [131]. Es wurde beschrieben, dass von den drei TGF- β -Isoformen TGF- β 1 die stärkste chemotaktische Wirkung gegenüber Osteoblasten aufweist [66]. Somit kann

Diskussion

TGF- β 1 eine Kaskade von Ereignissen auslösen, die die Synthese und Ablagerung von Kollagen fördern und letztendlich zur neuen Knochenbildung führen [129]. Dies kann auch durch die Arbeit von Zimmermann und seinen Kollegen bestätigt werden, die darauf hindeutet, dass unzureichender Anstieg und ein rascher Abfall des TGF- β nach einer Fraktur eine Pseudoarthrose vorhersagen können [68]. Deswegen ist es davon auszugehen, dass die TGF- β -Signalübertragung für die normale Gewebereparatur von wesentlicher Bedeutung ist [133] und die Initiierung der Frakturheilung von ausreichender Verfügbarkeit von TGF- β 1 abhängig ist [68]. Gleichzeitig kann man nicht leugnen, dass seine systemische Überrepräsentation bei chronischen Entzündungskrankheiten die Heilung von Frakturen negativ beeinflusst [11]. Diese Annahme wird auch durch die Untersuchungen von Balooch *et al.* unterstützt, die zeigen, dass obwohl TGF- β erforderlich ist, um eine Frakturheilung einzuleiten, chronisch erhöhte TGF- β -Spiegel die Materialeigenschaften der reparierten Knochenmatrix beeinträchtigen können [10].

Zusätzlich zur dem bereits gut erforschten kanonischen Smad-vermittelten Signalübertragung wirkt TGF- β auch über andere, Smad-unabhängige Signalwege, die durch intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aktiviert werden können [133]. Die einzigen bekannten Enzyme, die ausschließlich der ROS-Erzeugung gewidmet sind, sind NADPH-Oxidasen mit ihren katalytischen Untereinheiten (NOX) [75, 140]. Die Arbeit von Mark und Kollegen berichtete, dass obwohl ROS für die menschliche Gesundheit essentiell ist, überschüssige, durch NADPH-Oxidase erzeugte ROS zahlreiche pathologische Zustände fördern können [41], einschließlich Knochenerkrankungen [130]. Diese Diskrepanz hängt möglicherweise mit der gewebespezifischen Häufigkeit verschiedener NADPH-Oxidase-Isoformen und ihrer differentiellen Regulation in verschiedenen Modellen zusammen [112].

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung von rhTGF- β 1 auf die Vitalfunktionen von primären humanen Osteoblasten unter Berücksichtigung von oxidativen Stressreaktionen und deren mögliche Bedeutung bei der Behandlung von Knochendefekten. Es kann davon ausgegangen werden, dass TGF- β die NADPH-Oxidase aktiviert, was zur Akkumulation von ROS führt und somit die Vitalaktivität primärer humaner Osteoblasten beeinflussen kann.

Es stellt sich aber nun die Frage: Wie viel ROS Produktion ist sinnvoll und wo ist die Grenze zwischen Nutzen und Schaden für den Körper? Das heutige Wissen, um

Diskussion

diese Vorgänge ermöglicht es, TGF- β 1 als potentiell molekulares Target bei der Behandlung von Knochenfrakturen zu betrachten.

In der Anfangsphase des experimentellen Teils wurde die Expression von Genen, die mit oxidativem Stress assoziiert sind, unter Gebrauch des humanen RT² Profiler PCR-Arrays Oxidativer Stress Plus überprüft, aufgrund dessen wir eine TGF- β 1-abhängige Hochregulation von NOX4 identifiziert.

NOX4 ist ein Mitglied der NADPH-Oxidase-Familie, die in vielen Zelltypen exprimiert wird und ROS produziert. Die aktuell bekannten Quellen berichten, dass NOX4 nur p22phox benötigt, um seine enzymatische Aktivität auszuüben und H₂O₂ konstitutiv ohne andere zytosolische Komponenten erzeugt [69, 140]. Es wurde auch berichtet, dass die Modulation seiner Aktivität nur mit Änderungen in der Gentranskription zusammenhängt [28]. Auf der anderen Seite wurde auch eine induzierbare Expression von NOX4 berichtet. Es ist schon bekannt, dass TGF- β 1 die Expression von NOX4 in verschiedenen Zelltypen induziert [69].

Waning *et al.* fanden heraus, dass TGF- β , der als Ergebnis einer durch Metastasen verursachten Knochenzerstörung von der Knochenoberfläche freigesetzt wird, die Nox4 im Skelettmuskel von Mäusen hochreguliert [132]. In der Arbeit von Melzer und Kollegen wurde bestätigt, dass der TGF- β / Smad-Weg Genotoxizität und in Brustepithelzellalterung durch Induktion von NADPH-Oxidasen vermittelt und TGF- β eine erhöhte Regulation der NOX4- und ROS-Produktion induzieren kann [136]. Dies unterstützt unsere Ergebnisse, das rhTGF- β 1 die Expression und Synthese von NOX4 in primären humanen Osteoblasten induziert.

Weiter ist bekannt, dass eine übermäßige NOX-vermittelte Produktion von ROS einen Zustand chronischer Entzündung auslösen und den Beginn degenerativer und neoplastischer Erkrankungen begünstigen könnte [46]. NOX4, als eine konstitutiv aktive enzymatische Quelle von ROS, kann zur Entwicklung solcher Störungen beitragen [130]. Einhergehend mit diesen Beobachtungen konnten wir durch die übermäßige Expression von NOX4, auch eine NADPH (Substrat für die NOX) abhängige Akkumulation von ROS in unseren rhTGF- β 1 behandelten primären humanen Osteoblasten nachweisen. Die Zugabe von NADPH führte zu einer signifikanten Zunahme der intrazellulären ROS-Bildung in den mit rhTGF- β 1 stimulierten primären humanen Osteoblasten, was auf eine erhöhte NOX-Aktivität hinweist.

Diskussion

Erste Hinweise auf die knochenheilende Wirkung von TGF- β ergaben sich 1991 aus Studien zur Reparatur kritischer Größendefekte im Kaninchenschädel, bei denen eine einzelne Anwendung von TGF- β zu einer vollständigen Knochenbindung von Schädeldefekten führte [129]. Um diese Ergebnisse auch hinsichtlich der klinischen Signifikanz zu interpretieren, war es sehr wichtig den Einfluss von rhTGF- β 1 auf die Migration (Scratch Assay) von primären humanen Osteoblasten zu überprüfen. Dieses Experiment zeigte, dass das Schließen der Lücke im Zellrasen in Gegenwart von dem Wachstumsfaktor rhTGF- β 1 beschleunigt wurde, während das Zellwachstum nur geringfügig stimuliert wurde. Diese Analyse zeigte auch, dass durch die Hemmung des TGF- β 1-Signals mit dem Alk5-Inhibitor (SB431542) das Wachstum und die Bewegung der Osteoblasten signifikant verringert wurden. Wir nahmen an, dass die Aktivierung des kanonischen TGF- β -Signalwegs der Schlüssel zu den beobachteten Effekten ist, da SB431542 ein selektiver Inhibitor der Smad3-Phosphorylierung ist [135]. Tang und Kollegen zeigten anhand von *in-vitro*- und *in-vivo*-Modellen, dass aktives TGF- β 1, welches während der Knochenresorption freigesetzt wird die Migration von Knochenmark-Stromazellen zu den Knochenresorptionsstellen induziert [137].

Infolgedessen stellt sich die Frage, welcher Prozess (Zellproliferation oder Migration) dazu beiträgt? Um dies zu beantworten, waren weitere Versuche erforderlich.

Da unsere Ergebnisse eine rhTGF- β 1-abhängige Aktivierung von NOX4 auf Proteinebene bestätigten, wurden Western Blots mit den entsprechenden Markern durchgeführt, um die Bedeutung dieser Veränderungen in den Prozessen der Migration und Proliferation von Osteoblasten zu untersuchen. Es wurde berichtet, dass eine verstärkte NOX4-Expression durch ROS-Signalmodulation an der Proliferation und dem Überleben von menschlichen Gliom- [141], Melanom- und Prostatakrebszellen beteiligt ist [140]. Proliferation ist eine Zunahme der Anzahl von Zellen, die aufgrund von Mitose auftritt und das Wachstum und die Reparatur von Gewebe gewährleistet. Die bekanntesten Marker für die Zellproliferation sind Ki-67 (MKI67) und PCNA. Ki-67 (ein Marker für proliferierende Zellen in den G1-, S-, G2-Phasen) ist ein Nicht-Histon-Protein, das sich im Nukleolus von Zellen befindet. Aber während der Teilung bindet es an Chromatin und wird nach der Teilung im Nukleoplasma detektiert. Yang und Kollegen stellten fest, dass das Ausmaß der MKI67-Expression von der Expression von TGF- β 1 abhängt und die Proliferation und die Differenzierung in Leberkrebsgeweben und HepG2-Zelllinien reguliert [138].

Diskussion

Western-Blot unter Verwendung des Ki-67-Zellproliferationsmarkers war nicht erfolgreich. Wie in den Methoden bereits beschrieben, ist Western Blot ein komplexes und mehrstufiges Verfahren, in dem die Wirksamkeit des Experiments von sehr vielen Faktoren abhängt. In dem Fall ist es wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Affinität der verwendeten Antikörper zu gering war.

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ist ein Hilfsprotein der DNA-Polymerase, das in allen Zellen in einem Teilungszustand vorliegt und als ein Marker für proliferierende Zellen in Phase S funktioniert. Im Vergleich zu Ki-67 hat PCNA die Fähigkeit, DNA zu reparieren, nachdem es beschädigt wurde. Die Arbeit Wildemann *et al.* demonstrierte, dass die Verwendung des immunhistochemischen PCNA-Markers zur Analyse der Zellproliferation eine gute Korrelation zwischen der Proliferationsrate in Chondrozyten und der topischen Anwendung von TGF- β 1 zeigte, nämlich eine frühere Frakturheilung und eine verbesserte Reifung des Kallusgewebes im Vergleich zur Kontrollgruppe [139]. Bei der Untersuchung der Expression des PCNA-Markers wurde keine statistisch signifikante Änderung der Zellproliferation in primären humanen Osteoblasten, die durch den Wachstumsfaktor rhTGF- β 1 stimuliert wurden, nachgewiesen.

Viele Rollen, die NOX in verschiedenen Geweben und physiopathologischen Zuständen innehat, wurden mithilfe der *in-vitro*- und *in-vivo*-Wirkung von NOX-Inhibitoren entdeckt [46]. Zur weiteren Analyse der Rolle von NOX4 im intrazellulären rhTGF- β 1-Signal in Osteoblasten betätigten wir uns eines NOX4 Inhibitors, dem Apocynin welcher einer der am häufigsten beschriebenen NOX4 Inhibitoren darstellt [109].

Die Co-Inkubation mit dem NOX4-Inhibitor Apocinin zeigte sich in einer unbedeutenden Erhöhung der Expression von Markern aktiv proliferierender Zellen im Vergleich zu Zellen ohne Stimulation durch den Wachstumsfaktor rhTGF- β 1.

Daher scheinen die durch TGF- β 1 hervorgerufenen Genexpressionsveränderungen von NOX4 die Proliferation von Osteoblasten nicht zu beeinflussen und wurden von uns nicht weiter als Mechanismus zum Schließen der Lücke angesehen. Auch Boudreau *et al.* zeigten auf der Basis der durchgeführten Untersuchungen, dass das NOX4 keine Wirkung auf die TGF- β -vermittelte Zellproliferation hat aber entscheidend für die Zellmigration ist [36]. Die Hemmung von NOX4 in Magenkrebs-Zelllinien (GC) mit hoher NOX4-Expression beeinflusste die Zellproliferation nicht, obwohl es die Zelladhäsion und die Zellinvasion von GC-Zellen inhibierte [143].

Diskussion

Gleichzeitig haben Sturrock und Kollegen festgestellt, dass in Muskelzellen der menschlichen Lungenarterie (HPASMC) TGF- β 1 die Proliferation durch Hochregulieren der Nox4- und ROS-Produktion mit vorübergehender oxidativer Inaktivierung von Phosphatasen und Verstärkung der Wachstumssignalkaskaden erleichtert [134]. Inkonsistenzen in den Forschungsergebnissen können auf Unterschiede in den Zelltypen zurückzuführen sein.

Migration ist eine gerichtete Bewegung von Zellen als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli wie Zytokine und Wachstumsfaktoren [73]. Man darf aber nicht vergessen, dass Veränderungen im Substrat, auf denen sich Zellen bewegen, auch die Zellmigration beeinflussen [9, 73]. Hurd *et al.* zeigten 2012, dass Gradienten von Chemokinen zur Steuerung der Zellmigration verwendet werden. Werden Chemoattraktoren von Transmembranproteinen auf der Oberfläche von migrierenden Zellen absorbiert lenkt dies deren Migration mittels Veränderungen im Zytoskelett und der Zelladhäsion [9].

Einige Literaturquellen haben bereits Beispiele angeführt, dass die Aktivierung von NOX4 und die damit verbundene Zunahme von ROS den Mechanismus der Zellmigration in verschiedenen Arten von Zellen auslösen [70, 110-112]. In Nageltiermodellen konnte dargestellt werden, dass durch die Herunterregulierung von NOX4 die durch Hyperoxie induzierte Zellmigration und die Entstehung von Kapillarröhrchen abgeschwächt wird, was darauf hindeutet, dass die durch NOX4 erzeugten ROS die Motilität der Endothelzellen regulieren [70, 148]. Ähnliche Ergebnisse werden von Boudreau *et al.* präsentiert, wobei die Überexpression von NOX4 die Migration von Tumorepithelzellen über die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) induziert [36]. Die Ergebnisse der Arbeit von Ribeiro-Pereira *et al.* deuten darauf hin, dass ROS, das von NOX4 stammt, den FAK-Signalweg in der hochmetastatischen menschlichen Melanomzelllinie MV3 zu modulieren scheint [140] und das Überleben, die Migration und die Invasion reguliert [142]. Auch bei der Migration der vaskulären glatten Muskelzellen führt die Induktion von NOX4 und assoziierter ROS-Akkumulation zu einer Aktivierung der FAK [72]. Ursprünglich nahmen wir eine Erhöhung der Aktivität von FAK nach demselben Prinzip auch in den primären humanen Osteoblasten an. Western Blot-Verfahren, die im Rahmen des experimentellen Teils dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten eine starke basale FAK Aktivität in primären humanen Osteoblasten. Diese konnte durch rhTGF- β 1 kaum weiter gesteigert werden. Auch durch die Immunfluoreszenzfärbung wurde

Diskussion

dieser Mechanismus nicht bestätigt. Allerdings wurde die Migration der Zellen durch Gabe eines FAK Inhibitors signifikant verlangsamt, sodass dieser Mechanismus nicht ausgeschlossen werden darf [65].

Einer der Marker für migrierende Zellen ist Vimentin. Trotz der Tatsache, dass seine Rolle bei der Zellmigration nach wie vor unzureichend untersucht ist, gibt es in letzter Zeit eine zunehmende Anzahl von Daten zu neuen Vimentin-Funktionen, die mit der Migration zusammenhängen. Als Beispiel dienen die Bestimmung der Polarität einer migrierenden Zelle, die Regulierung der Bildung verschiedener Zellkontakte, die Organisation und den Transport der Signalproteine sowie die Regulation der Zellmotilität [73]. Eckes *et al.* zeigten in Mausversuchen eine Korrelation zwischen Vimentin-Mangel und einer Abnahme der Wundheilungsrate [74]. Des Weiteren wurde festgestellt, dass TGF- β -Spiegel an Stellen von Tumormetastasen oder Knochenfrakturen erhöht ist [10, 132]. Bei Zellen vieler Tumoren epithelialen Ursprungs ist die Vimentin-Expression auch während der Metastasierung üblich, was mit einer erhöhten Mobilität und Invasivität von Tumorzellen einhergeht. Im Umkehrschluss führt die Hemmung der Expression von Vimentin in Tumorzellen aber zu einer Abnahme der Mobilität und Invasivität [73]. Lin *et al.* fanden auch heraus, dass TGF- β 1 ein Schlüsselfaktor ist, der den gesamten Prozess des epithelialen-mesenchymalen Übergangs (EMT) induziert und die Vimentinexpression erhöht, was die Streuung, Invasion und Metastasierung von Leberkrebszellen (HepG2) steuert [144].

Sancho *et al.* zeigten, dass die *in-vitro*-Verabreichung von TGF- β die Aktivierung von Leber-Sternzellen (HSC) induzierte, was von einer Hochregulierung von NOX4, Vimentin und extrazellulären Matrixgenen, wie dem Kollagen I und dem Fibronectin begleitet war. In Abwesenheit von TGF- β wurde diese Aktivierung nicht beobachtet, ebenso wurde die Vimentinexpression während der NOX4-Inhibierung signifikant verringert, was darauf hindeutet, dass NOX4 unterhalb von TGF- β wirkt und durch die ROS-Bildung die Vimentinexpression während der Entwicklung der menschlichen Leberfibrogenese kontrolliert [145].

Auf der Basis dieser Daten kommen wir zu der Annahme, dass rhTGF- β 1 die Expression von NOX4 induziert, was wiederum zur Aktivierung von Vimentin führt, und somit die Osteoblasten- oder deren Vorläuferzellmigration beeinflusst. Auf Proteinebene unter Verwendung von Western Blot beobachteten wir jedoch nur einen geringfügigen Anstieg des Vimentin-Spiegels in rhTGF- β 1 stimulierten

Diskussion

primären humanen Osteoblasten. Jedoch muss erwähnt werden, dass qualitative Veränderungen im Proteinprofil durch die Blockierung der NOX4-Aktivität / ROS-Bildung mit Apocynin ausgelöst wurden. Somit scheint die durch Apocynin induzierte Hemmung von NOX4 eine Schlüsselrolle für den beobachteten Verlust der Osteoblastenmigration zu spielen [152]. Um die auf Proteinebene unter Verwendung der Western Blot-Methode erzielten Ergebnisse zu verstärken, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Vimentin durchgeführt. Die erhaltenen Bilder zeigen deutlich eine erhöhte Konzentration von Vimentin an der Migrationsfront im Vergleich zu weiter entfernten Regionen.

Die Bedeutung der TGF β -induzierten ROS-Freisetzung von NOX4 bei der EMT im Pankreasadenokarzinom wurde von Hiraga *et al.* gezeigt [146]. Dabei wurde festgestellt, dass von NOX4 abgeleitete ROS mesenchymale Marker wie N-Cadherin und Vimentin aktivieren, was zu interzellulärer Dissoziation führt und dadurch die Zellen ein Migrations- und Invasionspotential erwerben [146]. Daher kann gefolgert werden, dass eine Kette von Ereignissen (lokale TGF- β 1 Freisetzung - Expression von NOX4 - ROS-Akkumulation – Vimentin-Expression), die zur Zellmigration führen, von Interesse sein kann, um als Mechanismus für einen neuen therapeutischen Ansatz beim Lösen bestimmter pathologischer Zustände der Knochenheilung weiter untersucht zu werden.

6. Zusammenfassung

Wie aus zahlreichen Literaturquellen bekannt, beschränken sich die ROS-Funktionen nicht nur darauf Zellen zu schädigen, sondern wirken auch als Signalmoleküle bei einer Vielzahl reversibler regulatorischer Prozesse in nahezu allen Zellen und Geweben, einschließlich der Genexpression, sowie der Regulation des Zelltods und -wachstums, der Synthese von Biomolekülen und der Regulierung des Membranpotentials [46]. Es ist derzeit nicht klar, welche Mengen von ROS für den menschlichen Körper therapeutisch vorteilhaft sind.

Einer der bekanntesten Wachstumsfaktoren, welcher die Entwicklung von oxidativem Stress in einer großen Anzahl von Zelltypen beeinflusst, ist der transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1). Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Rolle und den Mechanismus der Wirkung von oxidativem Stress auf durch TGF- β 1 stimulierte menschliche primäre Osteoblasten zu bestimmen.

Aus Spendergewebe (Spongiosa) isolierte Osteoblasten wurden mit 5 ng/ml rekombinantem humanem TGF- β 1 (rhTGF- β 1) stimuliert. Änderungen in der Genexpression, die mit oxidativem Stress assoziiert sind, wurden unter Gebrauch von human RT² Profiler PCR Array Oxidative Stress Plus bestimmt und die unter Anwendung der semi-quantitativen RT-PCR erhaltenen Ergebnisse verifiziert. Zusammenfassend zeigten mit rhTGF- β 1 stimulierte primäre humane Osteoblasten eine signifikante Induktion der Expression von *NOX4*. Diese Tatsache wurde auch auf Proteinebene gestützt. Als Ergebnis führte die *NOX4*-Expression zur Anhäufung reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was durch den DCFH-DA Assay bestätigt wurde. Um den Effekt von rhTGF- β 1 auf die Migration und Proliferation von OB zu untersuchen, wurde ein sogenannter Scratch-Assay durchgeführt. Mit 5 ng/ml rhTGF- β 1 stimulierte primäre humane Osteoblasten zeigten eine signifikant schnellere „Wundheilung“ als unstimulierte Zellen. Die Veränderung von Proliferation und Migration von Zellen wurde weiter durch Western-Blot bestimmt [154]. Auf Proteinebene zeigte sich die Proliferationsrate unwesentlich verändert in rhTGF- β 1 stimulierten Osteoblasten. Im Gegensatz dazu wurde ein Anstieg des Vimentin-Spiegels, einem Marker für migrierende Zellen beobachtet. In Bestätigung des Obigen wurde auch eine Immunfluoreszenzfärbung mit Vimentin durchgeführt.

Um die funktionale Rolle von *NOX4*-Aktivität in der Osteogenese separat zu bewerten, wurden die Zellen mit dem *NOX4*-Inhibitor Apocynin stimuliert. Die von uns

Zusammenfassung

ermittelten Daten lassen annehmen, dass die chemische Inhibierung von NOX4 keinen Einfluss auf die Proliferation, aber einen ungünstigen Einfluss auf die Migration hat [152]. Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse also dahingehend interpretieren, dass die chemische Hemmung von NOX4 mit Apocynin die Migration von primären humanen Osteoblasten verlangsamt und stört.

Bei Schäden an Organen und Geweben spielt die Zellmigration eine entscheidende Rolle bei Schutzvorgängen wie Wundheilung, Entzündung und Immunantwort [73]. Somit erscheint die TGF- β 1-induzierte NOX4-Expression eine entscheidende Rolle bei der Osteoblasten-Migration zu spielen, wodurch die Bedeutung von NOX komplexer wird und es als neues therapeutisches Ziel bei dem Prozess der Knochenregeneration betrachtet werden kann.

7. Ausblick

Um ein tiefes und umfassendes Verständnis aller Prozesse des Knochenstoffwechsels und damit der Klärung der universellsten Regulationsmethoden zu erreichen, benötigt die Wissenschaft möglicherweise noch mehrere Jahrzehnte. In dieser Arbeit konnten wir nur einen kleinen Teil der Regulationsmechanismen von TGF- β auf Osteoblasten berühren.

Die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase durch Überexpression von NOX4 konnte in dieser Arbeit nicht dargestellt werden. Es ist jedoch bekannt, dass deren Aktivität während der Migration der vaskulären glatten Muskelzellen [72] und der Migration von Tumorepithelzellen [36] aktiviert wird. Dies konnte auch in Folgearbeiten der Arbeitsgruppe bei der Migration von Osteoblasten gezeigt werden [65]. Daher muss die Wirkung von rhTGF- β 1 auf die Osteoblastenmigration unter Berücksichtigung beider Mechanismen weiter untersucht werden.

Weiter ist zu bedenken, dass die Basis der Migration die Beweglichkeit der Zelle ist: sowohl die Bewegung der intrazellulären Komponenten und Strukturelemente der Zelle als auch die Bewegung der Zelle selbst relativ zum Substrat [73]. Somit ist die Bedeutung weiterer Einflussfaktoren, die bei Auswertung der Untersuchungsergebnisse eine wesentliche Rolle spielen können nicht zu vergessen. Im Weiteren sollte auch die inhibitorische Rolle von Plumbagin auf die NOX4-Aktivität untersucht werden. Es wurde schon gezeigt, dass Plumbagin, Naphthochinon, das aus Pflanzen gewonnen wird, bei Tieren eine antikarzinogene und anti-atherosklerotische Wirkung hat, direkt mit NOX4 interagiert und dessen Aktivität hemmt [77].

Abschließend ist zu sagen, dass der Schlüsselfaktor die Menge der reaktiven Sauerstoffspezies ist, in denen sich die Körperzellen im Gleichgewicht befinden. Bei einem Überschuss an ROS treten Ungleichgewicht und Stress auf, die im Laufe der Zeit zu chronischen Entzündungen und damit verbundenen pathologischen Zuständen führen.

8. Literaturverzeichnis

1. Churov, A.V., Oleinik, E.K., Oleynik, V.M.: The role of transforming growth factor β in the formation of immunosuppression in oncogenesis. *Journal of Cytokines and Inflammation*, Nr. 3, 2009
2. Ketlinsky, S.A., Simbirtsev, A.S.: *Cytokines*. St. Petersburg: LLC "Verlag Foliant", p. 369-378, 2008
3. Gleizes, P.E., Munger, J.S., Nunes, I. *et al.*: TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem. Cells*. Vol. 15 (3). p. 190–197, 1997
4. Babyshkina, N.N., Malinovskaya, E.A., Stakheyeva, M.N., Volkomorov, V.V., Ufandiev, A.A., Slonimskaya, E.M.: Role of transforming growth factor TGF- β 1 in pathogenesis of breast. *Cancer Research Institute, SB RAMS, Tomsk SIBIRISCHES ONKOLOGIE-JOURNAL*. Nr. 6, 2010
5. Guskow, E.P., Shkurat, T.P., Vardouni, T.V., Mashkin, E.V., Pokudina, I.O., Shimanskaya, E.I., Guskow, G.E., Belichenko, N.I., Aleksandrova, A.A.: *Genetics of oxidative stress*. Rostov-on-Don: Verlag SKNC VSCH SFU, 2009
6. Professor, Akademiker der Russischen Akademie der Naturwissenschaften und International Academy of Ecology and Life Protection Sciences Nazarov, I.P.: Pathophysiology of oxidative stress. *Antioxidant-Antihypoxate*. Siberian medical portal, 31.10.2013
7. Halliwell, B., Gutteridge, M.C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 2000
8. Domazetovic, V., Marcucci, G., Iantomasi, T., Brandi, M.L., Vincenzini, M.T.: Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 14(2):209-216, 2017
9. Hurd, T.R., DeGennaro, M., Lehmann, R.: Redox regulation of cell migration and adhesion. *Trends Cell Biol*. 22(2):107-15, 2012
10. Balooch, G., Balooch, M., Nalla, R.K., Schilling, S., Filvaroff, E.H., Marshall, G.W., Marshall, S.J., Ritchie, R.O., Derynck, R., Alliston, T.: TGF- β regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. *Engineering, Physiology*, 2005
11. Ehnert, S., Baur, J., Schmitt, A., Neumaier, M., Lucke, M., Dooley, S., Vester, H., Wildemann, B., Stöckle, U., Nussler A.K.: TGF- β 1 As Possible Link between Loss of Bone Mineral Density and Chronic Inflammation. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014073>, 2010
12. Schröder, K.: NADPH oxidases in redox regulation of cell adhesion and migration. *Antioxid Redox Signal*. 20(13):2043-58, 2014
13. Brown, K.D., Shah, M.H., Liu, G.S., Chan, E.C., Crowston, J.G., Peshavariya, H.M.: Transforming Growth Factor β 1-Induced NADPH Oxidase-4 Expression and

Fibrotic Response in Conjunctival Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 58(7):3011-3017, 2017

14. Kazakova, B.C., Chuyev, V.P., Novikov, O.O., Zhilyakova, E.T., Fadeeva, D.D.: Using growth factors in restoration bone. Review. Belgorod State University national research university CJSC "Vladmyva", Belgorod, Scientific statements Medicine. Pharmacy. Nr. 4(99). Issue 13/2, 2011

15. Clarke, B.: Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* (Suppl 3): p. 131–139, 2008

16. Matsuo, K.: Cross-talk among bone cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 18(4):292-7, 2009

17. Riancho, J.A., Delgado-Calle, J.: Osteoblast-osteoclast interaction mechanisms. *Reumatol Clin. Suppl 2*:p. 1-4, 2011

18. De Baat, P., Heijboer, M.P., de Baat, C.: Development, physiology, and cell activity of bone. *Ned Tijdschr Tandheelkd.* 112(7):258-63, 2005

19. Henriksen, K., Neutzsky-Wulff, A.V., Bonewald, L.F., Karsdal, M.A.: Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone.* 44(6):1026-33, 2009

20. Nakashima, T.: Stress and cell communication between bone cells. *Clin Calcium.* 23(11):1595-603, 2013

21. Nakashima, T.: Regulation of bone homeostasis by bone cells. *Clin Calcium.* 23(2):218-28, 2013

22. Nakashima, T., Hayash, M., Takayanagi, H.: Regulation of bone resorption by osteocytes. *Clin Calcium.* 22(5):685-96, 2012

23. Sims, N.A., Gooi, J.H.: Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 19(5):444-51, 2008

24. Aumüller, G., Aust, G., Doll, A. *et al.*: Anatomie. Duale Reihe, 2010

25. Anderhuber, F., Pera, F., Streicher, J.: Waldeyer Anatomie des Menschen. 19 Auflage by Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 2012

26. Lippert, H., Herbold, D., Lippert-Burmester, W.: Anatomie. 7 Auflage, Urban & Fischer Verlag München, 2002

27. Rohen, J.W., Lütjen-Drecoll, E.: Funktionelle Anatomie des Menschen. 11 Auflage by Schattauer GmbH Stuttgart, 2006

28. Carmona-Cuenca, I., Roncero, C., Sancho, P., Caja, L., Fausto, N., Fernández, M., Fabregat, I.: Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *Journal of Hepatology* 49, 2008

29. Freude, T., Braun, K.F., Haug, A., Pscherer, S., Stöckle, U., Nussler, A.K., Ehnert, S.: Hyperinsulinemia reduces osteoblast activity in vitro via upregulation of TGF-β. Springer-Verlag, 2012

30. Harris, S.E., Bonewald L.F., Harris, M.A., Sabatini, M., Dallas, S., Feng, J.Q., Ghosh-Choudhury, N., Wozney, J., Mundy, G.R.: Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 9(6):855-63, 1994
31. Matsumoto, T., Abe, M.: TGF- β -related mechanisms of bone destruction in multiple myeloma. *Bone.* 48(1):129-34, 2011
32. Kanaan, R.A., Kanaan, L.A.: Transforming growth factor beta1, bone connection. *Med Sci Monit.* 12(8):RA164-9, 2006
33. Kassem, M., Kveiborg, M., Eriksen, E.F.: Production and action of transforming growth factor-beta in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation and modulation by calcitriol. *Eur J Clin Invest.* 30(5):429-37, 2000
34. Marie, P.: Growth factors and bone formation in osteoporosis: roles for IGF-I and TGF-beta. Review. *Rev Rhum Engl Ed.* 64(1):44-53, 1997
35. Fromigué, O., Modrowski, D., Marie, P.J.: Growth factors and bone formation in osteoporosis: roles for fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Curr Pharm Des.* 10(21):2593-603, 2004
36. Boudreau, H.E., Casterline, B.W., Rada, B., Korzeniowska, A., Leto, T.L.: Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 53(7):1489-99, 2012
37. Wu, J., Jin, Z., Zheng, H., Yan, L.J.: Sources and implications of NADH/NAD⁺ redox imbalance in diabetes and its complications. *Diabetes Metab Syndr Obes.* p. 145–153, 2016
38. Schröder, K.: NADPH oxidases in bone homeostasis and osteoporosis. Springer Basel, 2014
39. Goettsch, C., Babelova, A., Trummer, O., Erben, R.G., Rauner, M., Rammelt, S., Weissmann, N., Weinberger, V., Benkhoff, S., Kampschulte, M., Obermayer-Pietsch, B., Hofbauer, L.C., Brandes, R.P., Schröder, K.: NADPH oxidase 4 limits bone mass by promoting osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 123(11):4731-8, 2013
40. José, G.S., Fortuño, A., Beloqui, O., Díez, J., Zalba, G.: NADPH oxidase *CYBA* polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clinical Science.* 114(3)173-182, 2008
41. Quinn, M.T., Cloud, M., Ammons, B., DeLeo, F.R.: The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clinical Science.* 111(1) 1-20, 2006
42. Kasagi, S., Chen, W.: TGF-beta1 on osteoimmunology and the bone component cells. *Cell & Bioscience*, 2013
43. Heumüller, S., Wind, S., Barbosa-Sicard, E., Schmidt, H.H.H.W., Busse, R., Schröder, K., Brandes, R.P.: Apocynin Is Not an Inhibitor of Vascular Reduced

Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases but an Antioxidant. Hypertension, 2008

44. Stolk , J., Hiltermann , T.J., Dijkman , J.H., , A.J.: Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 11(1):95-102, 1994
45. Vejražka, M., Míček, R., Štípek, S.: Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. Institute of Medical Biochemistry, Charles University, Prague, Czech Republic, 2004.
46. Aldieri, E., Riganti, C., Polimeni, M., Gazzano, E., Lussiana, C., Campia I., Ghigo, D.: Classical Inhibitors of NOX NAD(P)H Oxidases Are Not Specific. *Current Drug Metabolism*, 2008
47. Kim, S.Y., Moon, K., Jo, H., Jeong, S., Seon, S., Jung, E., Cho, Y.S, Chun, E., Lee, K.: Anti-inflammatory effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in airway inflammation. *Immunology and Cell Biology* volume, p. 441–448, 2012
48. Petrônio, M.S., Zeraik, M.L., da Fonseca, L.M., Ximenes, V.F.: Apocynin: Chemical and Biophysical Properties of a NADPH Oxidase Inhibitor. *Molecules*, 2013
49. Green, M.R., Sambrook, J.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 4th Ed., 2012
50. Thermo Scientific Product Information Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012717_Revert.Aid_H_Minus_FirstStrand_cDNA_Syn_UG.pdf, 2015.
51. Ye, J., *et al.*: Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, p. 134, 2012
52. Lorenz, T.C.: Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*, 2012
53. Eprintsev, A.T., Popov, V.N., Fedorin. D.N.: Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Methodical-teaching aid for high schools Publishing and Polygraphic Center of Voronezh State University*, 2008
54. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75, 1951
55. Mahmood, T., Yang, P.: Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci.* 4(9): 429–434, 2012
56. Hirano, S.: Western Blot analysis. *Methods Mol Biol.*, 2012
57. Jensen, E.C.: The Basics of Western Blotting. <https://doi.org/10.1002/ar.22424>, *Anat Rec Hoboken.* 295(3):369-71, 2012
58. Hnasko, T.S., Hnasko, R.M. The Western Blot. *Methods Mol Biol.*, 2015
59. Donaldson J.G.: Immunofluorescence staining. *Curr Protoc Cell Biol.*, 2001

60. Janse J.D., Kokoskova, B.: Indirect immunofluorescence microscopy for the detection and identification of plant pathogenic bacteria (in particular for *Ralstonia solanacearum*). *Methods Mol Biol.*, 2009
61. Liang, C. C., Park, A. Y., Guan, J. L.: In vitro scratch assay. A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* 2, 329–333, 2007
62. Rodriguez, L.G., Wu, X., Guan, J.L.: Wound-healing assay. *Methods Mol Biol.*, 2005
63. Ehnert, S., Fentz, A.K., Schreiner, A., Birk, J., Wilbrand, B., Ziegler, P., Reumann, M.K., Wang, H., Falldorf, K., Nussler, A.K.: Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields cause antioxidative defense mechanisms in human osteoblasts via induction of O₂(-) and H₂O₂. *Sci Rep*, 2017
64. Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J., Ischiropoulos, H.: Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*, 2012
65. Ehnert, S., Linnemann, C., Aspera-Werz, R.H., Bykova, D., Biermann, S., Fecht, L., De Zwart, P.M., Nussler, A.K.: Immune cell-induced migration of osteoprogenitor cells is mediated by TGF- β dependent upregulation of NOX4 and activation of focal adhesion kinase. *Int J Mol Sci.*, 2018
66. Pfeilschifter, J., Wolf, O., Naumann, A., Minne, H.W., Mundy, G.R., Ziegler, R.: Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res*, 1990
67. Bonewald, L.F., Dallas, S.L.: Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J Cell Biochem.* 55(3):350-7, 1994
68. Zimmermann, G., Henle, P., Küsswetter, M., Moghaddam, A., Wentzensen, A., Richter, W., Weiss, S.: TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone.* 36(5):779-85, 2005
69. Katsuyama, M.: Nox/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: Its transcriptional regulation and physiological roles. *J Pharmacol Sci*, 2010
70. Pendyala, S., Gorshkova, I.A., Usatyuk, P.V., He, D., Pennathur, A., Lambeth, J.D., Thannickal, V.J., Natarajan, V.: Role of nox4 and nox2 in hyperoxia-induced reactive oxygen species generation and migration of human lung endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*, 2009
71. McCarty, M.F., DiNicolantonio, J.: Suppression of NADPH Oxidase Activity May Slow the Expansion of Osteolytic Bone Metastases. *Healthcare*, 2016
72. Datla, S.R., McGrail, D.J., Vukelic, S., Huff, L.P., Lyle, A.N., Pounkova, L., Lee, M., Seidel-Rogol, B., Khalil, M.K., Hilenski, L.L., Terada, L.S., Dawson, M.R., Lassègue, B., Griendling K.K.: Poldip2 controls vascular smooth muscle cell migration by regulating focal adhesion turnover and force polarization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 307(7):H945-57, 2014

73. Chernouvanenko, I.S., Minin, An.A., Minin, A.A.: Role of vimentin in cell migration. Russian Journal of developmental biology. Vol. 44, Nr. 3, p. 144-157, 2013
74. Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T., Martin, P.: Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. J Cell Sci. 113(Pt 13):2455-62, 2002
75. Altenhöfer, S., Radermacher, K.A., Kleikers, P.W., Wingler, K., Schmidt, H.H.: Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. Antioxid Redox Signal. 23(5):406-27, 2015
76. Minkenberg, I., Ferber, E.: Lucigenin-dependent chemiluminescence as a new assay for NAD(P)H-oxidase activity in particulate fractions of human polymorphonuclear leukocytes. J Immunol Methods. 71(1):61-7, 1984
77. Ding, Y., Chen, Z.J., Liu, S., Che, D., Vetter, M., Chang, C.H.: Inhibition of Nox-4 activity by plumbagin, a plant-derived bioactive naphthoquinone. J Pharm Pharmacol. 57(1):111-6, 2005
78. Walsh, J.S.: Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. Surgery (Oxford). Vol. 33, Issue 1, p. 1-6, 2015
79. Maggio, D., Barabani, M., Pierandrei, M., Polidori, M.C., Catani, M., Mecocci, P., Senin, U., Pacifici, R., Cherubini, A.: Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. J Clin Endocrinol Metab. 2003
80. Ostman, B., Michaelsson, K., Helmersson, J., Byberg, L., Gedeberg, R., Melhus, H., Basu, S.: Oxidative stress and bone mineral density in elderly men: antioxidant activity of alpha-tocopherol. Free Radic Biol Med., 2009
81. Yousefzadeh, G., Larijani, B., Mohammadirad, A., Heshmat, R., Dehghan, G., Rahimi, R., Abdollahi, M.: Determination of oxidative stress status and concentration of TGF-beta 1 in the blood and saliva of osteoporotic subjects. Ann N Y Acad Sci., 2006
82. Gressner, A.M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., Dooley, S.: Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. Front Biosci, 2002
83. Kanzler, S., Baumann, M., Schirmacher, P., Dries, V., Bayer, E., *et al.*: Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. J Viral Hepat, 2001
84. Crockett, J.C., Rogers, M.J., Coxon, F.P., Hocking, L.J., Helfrich, M.H.: Bone remodelling at a glance. Journal of Cell Science, 2011
85. Everts, V., Delaisse, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P., Beertsen, W.: The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. J. Bone Miner., 2002
86. Andersen, T.L., Sondergaard, T.E., Skorzynska, K.E., Dagnaes-Hansen, F., Plesner, T.L., Hauge, E.M., Plesner, T., Delaisse, J.M.: A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. Am J Pathol. 174(1):239-47, 2009
87. Bonewald, L.F., Johnson, M.L.: Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. Bone. 42(4):606-15, 2008

88. Jacobs, C.R., Temiyasathit, S., Castillo, A.B.: Osteocyte mechanobiology and pericellular mechanics. *Annu Rev Biomed Eng.*, 2010
89. Scheiner, S., Hellmich, C.: Patient-specific design of tissue engineering scaffolds, based on mathematical modeling. *Advances in Ceramic Biomaterials Materials, Devices and Challenges*, 2017
90. Dieudonne, S.C., Foo, P., van Zoelen E.J., Burger, E.H.: Inhibiting and stimulating effects of TGF-beta 1 on osteoclastic bone resorption in fetal mouse bone organ cultures. *J Bone Miner Res*, 1991
91. Hattersley, G., Chambers, T.J.: Effects of transforming growth factor beta 1 on the regulation of osteoclastic development and function. *J Bone Miner Res.*, 1991
92. Robling, A.G., Castillo, A.B., Turner, C.H.: Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.*, 2006
93. Bonewald, L.F.: The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 26(2):229-38, 2011
94. Rydziel, S., Varghese, S., Canalis, E.: Transforming growth factor beta1 inhibits collagenase 3 expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms in osteoblast cultures. *J Cell Physiol.* 170(2):145-52, 1997
95. Prior, K., Leisegang, M.S., Josipovic, I., Löwe, O., Shah, A.M., Weissmann, N., Schröder, K., Brandes, R.P.: CRISPR/Cas9-mediated knockout of p22phox leads to loss of Nox1 and Nox4, but not Nox5 activity. *Redox Biol*, 2016
96. Brandes Ralf P., Weissmann, N., Schröder, K.: Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014
97. Pfeilschifter, J., Bonewald, L., Mundy, G.R.: Characterization of the latent transforming growth factor beta complex in bone. *J Bone Miner Res.* 5(1):49-58, 1990
98. Hunter, G.K., Hauschka, P.V., Poole, A.R., Rosenberg, L.C., Goldberg, H.A.: Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 317(Pt 1):59-64, 1996
99. Chen, F., Haigh, S., Barman, S., Fulton, D.J.: From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. *Front Physiol.* eCollection, 2012.
100. Li, M.; Liu, Z.; Zhuan, L.; Wang, T.; Guo, S.; Wang, S.; Liu, J.; Ye, Z.: Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats. *Mol. Med. Rep.*, 2012
101. Hur, J., Lee, P., Kim, M.J., Kim, Y., Cho, Y.W.: Ischemia-activated microglia induces neuronal injury via activation of gp91phox NADPH oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* p. 391, 1526–1530., 2010
102. Klees, R.F., De Marco, P.C., Salasznyk, R.M., Ahuja, D., Hogg, M., Antoniotti, S., Kamath, L., Dordick, J.S., Plopper G.E.: Apocynin Derivatives Interrupt Intracellular Signaling Resulting in Decreased Migration in Breast Cancer Cells. *J Biomed Biotechnol.* 2006
103. Breitenbach, M., Rinnerthaler, M., Weber, M., Breitenbach-Koller, H., Karl, T., Cullen, P., Basu, S., Haskova, D., Hasek, J.: The defense and signaling role of NADPH oxidases in eukaryotic cells. *Wien Med Wochenschr*, 2018

104. Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., Sumimoto, H.: A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem.* 276(2):1417-23, 2001
105. Bedard, K., Krause, K.H.: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87(1):245-313, 2007
106. Janssen-Heininger, Y.M.W., Mossman, B.T., Heintz, N.H., Forman, H.J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., Stamler, J.S., Rhee, S.G., van der Vliet, A.: Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls and promises. *Free Radic Biol Med.* Author manuscript. 45(1): 1–17, 2008
107. Chen, K., Kirber, M.T., Xiao, H., Yang, Y., Keaney, J.F. Jr.: Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol.* 181(7):1129-39, 2008
108. Tobar, N., Guerrero, J., Smith, P.C., Martínez, J.: NOX4-dependent ROS production by stromal mammary cells modulates epithelial MCF-7 cell migration. *Br J Cancer.* 103(7):1040-7, 2010
109. Wind, S., Beuerlein, K., Eucker, T., Müller, H., Scheurer, P., Armitage, M.E., Ho, H., Schmidt, H.H.H.W., Wingler, K.: Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 161(4): 885–898, 2010
110. Park, H.S., Chun, J.N., Jung, H.Y., Choi, C., Bae, Y.S.: Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 72(3):447-55, 2006
111. Lyle, A.N., Deshpande, N.N., Taniyama, Y., Seidel-Rogol, B., Pounkova, L., Du, P., Papaharalambus, C., Lassègue, B., Griendling, K.K.: Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 105(3):249-59, 2009
112. Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B.: Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid Redox Signal.* 20(7):1126–1167, 2012
113. Kazakova, V.S., Novikov, O.O., Zhilyakova, E.T.: Prospects for the use of growth factors in bone tissue regeneration. Literature review. *Network Scientific Practical Journal SERIES Medicine and Pharmacy* Nr3 doi: 10.18413/2313-8955-2015-1-3-151-158, 2015
114. Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Schulz, N., Hoff, P., Perka, C., Buttgerit, F., Volk, H.D., Lienau, J., Duda, G.N.: Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res.* 347(3):567-73, 2012
115. Schell, H., Duda, G.N., Peters, A., Tsitsilonis, S., Johnson, K.A., Schmidt-Bleek, K.: The haematoma and its role in bone healing. *J Exp Orthop*, 2017
116. Klyubin, I.V., Kirpichnikova, K.M., Gamaley, I.A.: Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. *Eur J Cell Biol.* 70(4):347-51, 1996
117. Office of the Surgeon General (US). Rockville (MD): Office of the Surgeon General (US): Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General, 2004

118. Okada, H., Takahashi, K., Ogura, N., Tomoki, R., Ito, K., Kondoh, T.: Plasma rich in growth factors stimulates proliferation, migration, and gene expression associated with bone formation in human dental follicle cells. *Journal of Dental Sciences*, p. 245-252, 2016
119. Wang W., Yeung, K.W.K.: Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*. Volume 2, Issue 4, p. 224-247, 2017
120. Shimono, K., Oshima, M., Arakawa, H., Kimura, A., Nawachi, K., Kuboki T.: The effect of growth factors for bone augmentation to enable dental implant placement: A systematic review. *Japanese Dental Science Review* 46, p. 43-53, 2010
121. Schieber, M., Chandel, N.S.: ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol*. 24(10): R453–R462, 2014
122. Sato, A.Y., Tu, X., McAndrews, K.A., Plotkin, L.I., Bellido, T.: Prevention of Glucocorticoid Induced-Apoptosis of Osteoblasts and Osteocytes by Protecting against Endoplasmic Reticulum (ER) Stress *in vitro* and *in vivo* in Female Mice. *Bone*, 2015
123. Almeida, M., O'Brien, C.A.: Basic Biology of Skeletal Aging: Role of Stress Response Pathways. *The Journals of Gerontology: Series A*, Volume 68, Issue 10, p.1197–1208, 2013
124. Brown, D.I., Griending, K.K.: Nox proteins in signal transduction. Review Article. *Free Radical Biology & Medicine* 47, p.1239–1253, 2009
125. Stefanska, J., Pawliczak, R.: Apocynin: Molecular Aptitudes. *Mediators Inflamm.*, 2008
126. Ismail, H. M., Scapozza, L., Ruegg, U.T., Dorchies O.M.: Diapocynin, a Dimer of the NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin, Reduces ROS Production and Prevents Force Loss in Eccentrically Contracting Dystrophic Muscle. *PLoS One*. 9(10): e110708, 2014
127. Barnes, G.L., Kostenuik, P.J., Gestenfeld, L.C., Einhorn, T.A.: Growth Factor Regulation of Fracture Repair. *JBMR*, Volume14, Issue11, p. 1805-1815, 1999
128. Bolander, M.E.: Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med*. 200(2):165-70, 1992
129. Beck, L.S., Deguzman, L., Lee, W.P., Xu, Y., McFatrige, L.A., Gillett, N.A., Amento, E.P.: Rapid publication. TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects. *J Bone Miner Res*. 6(11):1257-65, 1991
130. Wu, J., Niu, J., Li, X., Guo, Z., Zhang, F.: TGF-β1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *BMC Developmental Biology* volume 14, Article number: 21, 2014
131. Centrella, M., Casanighino, S., Kim, J., Pham, T., Rosen, V., Wozney, J., McCarthy, T.L.: Independent changes in type I and type II receptors for transforming growth factor beta induced by bone morphogenetic protein 2 parallel expression of the osteoblast phenotype. *American Society for Microbiology Journals*, 1995
132. Waning, D.,L., Mohammad, K.S., Reiken, S., Xie, W., Andersson, D.C., John, S., Chiechi, A., Wright, L.E., Umanskaya, A., Niewolna, M., Trivedi, T., Charkhzarrin, S., Khatiwada, P., Wronska, A., Haynes, A., Benassi, M.S., Witzmann, F.A., Zhen,

G., Wang, X., Cao, X., Roodman, G.D., Marks, A.R., GuiseExcess, T.A.:TGF- β mediates muscle weakness associated with bone metastases in mice. *Nature Medicine*. Volume 21, p. 1262–1271, 2015

133. Jain, M., Rivera, S., Monclus, E.A., Synenki, L., Zirk, A., Eisenbart, J., ferghali-Bostwick, C., Mutlu, G.M., Budinger, G.R., Chandel, N.S.: Mitochondrial Reactive Oxygen Species Regulate Transforming Growth Factor- β Signaling. *J Biol Chem*. 288(2): 770–777, 2013

134. Sturrock, A., Cahill, B., Norman, K., Huecksteadt, T.P., Hill, K., Sanders, K., Karwande, S.V., Stringham, J.C., Bull, D.A., Gleich, M., Kennedy, T.P., Hoidal, J.R.: Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 290(4):L661-L673, 2006

135. Laping, N.J., Grygielko, E., Mathur, A., Butter, S., Bomberger, J., Tweed, C., Martin, W., Fornwald, J., Lehr, R., Harling, J., Gaster, L., Callahan, J.F., Olson, B.A.: Inhibition of Transforming Growth Factor (TGF)- β 1–Induced Extracellular Matrix with a Novel Inhibitor of the TGF- β Type I Receptor Kinase Activity: SB-431542. *Molecular Pharmacology*. 62 (1) 58-64, 2002

136. Melzer, K., von der Ohe, J., Hass, R., Ungefroren, H.: TGF- β -Dependent Growth Arrest and Cell Migration in Benign and Malignant Breast Epithelial Cells Are Antagonistically Controlled by Rac1 and Rac1b. *Int J Mol Sci*. 18(7): 1574, 2017

137. Tang, Y., Wu, X., Lei, W., Pang, L., Wan, C., Shi, Z., Zhao, L., Nagy, T.R., Peng, X., Hu, Feng, J.X., Hul, W.V., Wan M., Cao, X.: TGF- β 1–induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nature Medicine*. Volume 15, p. 757–765, 2009

138. Yang, C., Su, H., Xiwen, L., Han, C.: Marker of proliferation Ki-67 expression is associated with transforming growth factor beta 1 and can predict the prognosis of patients with hepatic B virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Management and Research*. Volume 10:679-696, 2018

139. Wildemann, B., Schmidmaier, G., Ordell, S., Stange, R., Haas, N. P., Raschke, M.: Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied IGF-I and TGF- β 1: Comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU. *Journal of Biomedical Materials Research*. Volume 65B, Issue1, p. 150-156, 2003

140. Ribeiro-Pereira, C., Moraes, J.A., de Jesus Souza, M., Laurindo, F.R., Arruda, M.A., Barja-Fidalgo, C.: Redox Modulation of FAK Controls Melanoma Survival - Role of NOX4. *Research Article*, 2014

141. Shono, T., Yokoyama, N., Uesaka, T., Kuroda, J., Takeya, R., Yamasaki, T., Amano, T., Mizoguchi, M., Suzuki, S.O., Niuro, H., Miyamoto, K., Akashi, K., Iwaki, T., Sumimoto, H., Sasaki, T.: Enhanced expression of NADPH oxidase Nox4 in human gliomas and its roles in cell proliferation and survival. *Int J Cancer*. 123(4):787-92, 2008

142. Van Nimwegen, M.J., Van De Water, B.: Focal adhesion kinase: A potential target in cancer therapy. *73: 597–609*, 2007

143. Gao, X., Sun, J., Huang, C., Hu, X., Jiang, N., Lu, C.: RNAi-mediated silencing of NOX4 inhibited the invasion of gastric cancer cells through JAK2/STAT3 signaling. *Am J Transl Res.* 9(10): 4440–4449, 2017
144. Lin, X.L., Liu, M., Liu, Y., Hu, H., Pan, Y., Zou, W., Fan, X., Hu, X.: Transforming growth factor β 1 promotes migration and invasion in HepG2 cells: Epithelial-to-mesenchymal transition via JAK/STAT3 signaling. *Int J Mol Med.* 41(1): 129–136, 2018
145. Sancho, P., Mainez, J., Crosas-Molist, E., Roncero, C., Fernández-Rodríguez, C.M., Pinedo, F., Huber, H., Eferl, R., Mikulits, W., Fabregat I.: NADPH Oxidase NOX4 Mediates Stellate Cell Activation and Hepatocyte Cell Death during Liver Fibrosis Development. *PLoS One.* 7(9): e45285, 2012
146. Hiraga, R., Kato, M., Miyagawa, S., Kamata, T.: Nox4-derived ROS Signaling Contributes to TGF- β -induced Epithelial-mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells. *ANTICANCER RESEARCH.* 33: 4431-4438, 2013
147. Kappel, A., Polakowski, T., Pignot, M., Windhab, N., Behrendorf, H., Muth, J.: Method for detecting mutations in nucleotide sequences. United States Patent Application Publication Pub. Nr.: US 2004/0110161A1, 2004
148. Böhme, K., Dissertation: Toxicogenomics: Genexpressionsanalysen zur Charakterisierung und Identifizierung genotoxischer Verbindungen. DOI: 10.11588/heidok.00010997, 2010
149. Zhao, J., Dissertation: Warum manche Patienten nicht auf eine BMP2 oder BMP7 Therapie ansprechen: mögliche Inhibierung der Signalkaskade durch die TGF- β -bedingte Aktivierung von Histondeacetylasen via SnoN. Technischen Universität München, 2013
150. Gershtein, E.S., Timofeev, YU. S., Zuev, A.A., Kushlinslii, N.E.: RANK/RANKL/OPG ligand-receptor system and its role in primary bone neoplasms (literature analysis and own data). *ADVANCES IN MOLECULAR ONCOLOGY*, Vol.2, DOI: 10.17 650 / 2313-805X-2015-2-3-51-59, 2015
151. Haug, A.T., Dissertation: Der Effekt von Insulin auf primäre humane Osteoblasten in vitro. Technische Universität München, 2016
152. Heuberger, E. A., Dissertation: In primären humanen Osteoblasten hemmt TGF- β 1 die Genexpression von HDAC9 – eine mögliche Rolle bei der Osteogenese? Universität Tübingen, 2018
153. Rost, M., Dissertation: Untersuchungen über die Rolle der Untereinheit γ im Mechanismus der Energietransduktion in der Escherichia coli ATP-Synthase. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2001
154. Lange, M., Dissertation: Analyse der Signaltransduktionskaskade glattmuskulärer Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen. Charité – Universitätsmedizin Berlin, 2011
155. Reil, M. Dissertation: Essentielle Rollen des LEM-Domänen Proteins MAN1 während der Organentwicklung von *Xenopus laevis* und überlappende Funktionen von Emerin. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2013

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik, Tübingen unter Betreuung von Professor Dr. A. K. Nüssler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Professor Dr. A. K. Nüssler, Leiter des Siegfried Weller Instituts für unfallchirurgische Forschung der BG Klinik Tübingen und PD Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert, Laborleiterin der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Sämtliche Versuche wurden selbständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte in Abstimmung mit PD Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Alle inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Ich versichere die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten an der Eberhard Karls Universität beachtet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die hier vorliegende Dissertation nur in diesem und in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht wurde und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

10. Danksagung

Ich drücke dem Leiter meiner Doktorarbeit Herrn Prof. Dr. Andreas K. Nüssler eine tiefe Dankbarkeit aus, der mit mir eine unschätzbare Erfahrung geteilt, eine aufrichtige Teilnahme gezeigt hat und eine Allround-Unterstützung zur Verfügung gestellt hat.

Ich bin Frau Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation und der Informationen darüber, Hilfe bei der Durchführung von Experimenten und eines unerschöpflichen Optimismus unendlich dankbar. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich.

Mit freundlichen Grüßen bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors, wo ich das Vergnügen hatte zu arbeiten.

Ich danke meiner Familie, vor allem meinem Mann, Alexander Bykov, dass er nie an mir gezweifelt hat und mich immer unterstützt hat, auch wenn ich selbst ab und zu bereit war aufzugeben.